

Računalno istraživanje vezanja strukturnih derivata azitromicina u peptidil-transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije Escherichia coli

Čorak, Nina

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:210950>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nina Čorak

Računalno istraživanje vezanja strukturnih derivata
azitromicina u peptidil-transferazni centar velike podjedinice
ribosoma bakterije *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za fizikalnu kemiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Branimira Bertoše

Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvale

Zahvaljujem se mom mentoru izv. prof. Branimiru Bertoši na tome što me strpljivo uz mnogo truda i razumijevanja vodio kroz izradu ovog diplomskog rada. Znanja i vještine kojima me poučio obogatile su moje znanstveno iskustvo, a osim profesionalnih ponudio mi je i mnoge životne lekcije koje ću ponijeti sa sobom.

Također se zahvaljujem prof. Predragu Novaku na mnogim koristim savjetima koje je ponudio prije i tijekom izrade rada. Dragom kolegi Vedranu Vukoviću zahvaljujem na nesebičnoj pomoći i brojnim savjetima. Vedran me naučio kako niti jedan problem nije nerješiv, te da su pravi prijatelji uvijek uz tebe, čak i kad su u Francuskoj.

Veliko hvala upućujem svim svojim prijateljima i kolegama koji su zgrade Prirodoslovno-matematičkog fakulteta učinili mojim drugim domom. Posebno se moram zahvaliti mom Tinu na pažnji i razumijevanju te što je uvijek vjerovao u mene, kao i mojoj sestri Lani što mi je tijekom cijelog studija bila veliki oslonac.

Za kraj, najveću zahvalu upućujem svojim roditeljima na tome što su sve ove godine bili uz mene i pružili mi svu ljubav i pažnju bez kojih danas ne bi bilo ovog diplomskog rada. Moji roditelji najbolji su prijatelji koje čovjek može poželjeti i moji najveći uzori te se nadam da ću i ja jednog dana biti velika kao oni.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Računalno istraživanje vezanja strukturnih derivata azitromicina u peptidil-transferazni centar velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichia coli*

NINA ČORAK

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U sklopu ovog diplomskog rada istražene su interakcije između 10 različitih azitromicinskih derivata i veznog mjesta PTAR-a (engl. *peptidyl transferase-associated region*) velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichia coli* s ciljem dizajniranja novih, potencijalno efikasnih antibiotika. Vezanje azitromicinskih derivata u veznog mjesta PTAR-a istraženo je s pomoću računalnih metoda molekulskog uklapanja i Monte Carlo konformacijske pretrage. Prije računalnog istraživanja interakcija azitromicinskih derivata i veznog mjesta PTAR-a, konformacijski prostor svakog od 10 liganada pretražen je Monte Carlo algoritmom uz 4 različita modela otapala. Najpovoljniji konformeri pronađeni u svakom od modela otapala, kao i konformeri koji najbolje reprezentiraju grupe dobivene klaster analizom, korišteni su kao početne strukture prilikom istraživanja interakcija vezanja liganada u vezno mjesto PTAR-a.

Rezistencijski mehanizmi patogenih bakterija otežavaju primjenu makrolidnih antibiotika u kliničkoj praksi. Jedan od najčešćih oblika rezistencije koji nalazimo kod bakterijskih patogena je dimetilacija A2058 ili A2058G supstitucija unutar 23S rRNA. Temeljem provedenog računalnog istraživanja vezanja liganada u PTAR velike podjedinice prokariotskog ribosoma utvrđeno je da se ligand D efikasno veže u PTAR i u prisutnosti dimetiliranog A2058 što bi moglo značiti efikasnu primjenu ovog spoja i kod sojeva koji su razvili rezistenciju putem dimetiliranja A2058. Štoviše, ligand D u PTAR-u s dimetiliranim A2058 ima nižu energiju vezanja nego ligand D vezan u PTAR s A2058 koji nije metiliran. Efikasno vezanje liganda D uzrokovano je prvenstveno hidrofobnim interakcijama koje makrolaktonski prsten stvara s aminokiselinama Lys 90, Lys 91 i Arg 92, te s nukleotidom A751. Navedeni aminokiselinski i nukleotidni ogranci grade izlazni kanal PTAR-a te stoga spomenute interakcije predstavljaju potencijalno efikasni način blokiranja izlaznog kanala PTAR-a.

(88 stranica, 34 slika, 8 tablica, 42 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici, PMF – Biološki odsjek, Marulićev trg 20, Zagreb

Ključne riječi: rezistentni bakterijski sojevi, makrolidi, molekulsko uklapanje, Monte Carlo konformacijska analiza

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
Ocjenitelji: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Izv. prof. dr. sc. Branimir Bertoša
Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Rad prihvaćen: 21.6.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Computational study of interactions between azithromycin derivatives and peptidyl-transferase center of *Escherichia coli* ribosome

NINA ČORAK

Roosveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this graduate thesis is the designing of new, potentially effective antibiotics. Interactions between 10 different azithromycin derivatives and peptidyl-transferase center of the *Escherichia coli* ribosome were investigated by computational methods consisting of docking and Monte Carlo conformational searches. Prior to study of interactions between azithromycin derivatives and the PTAR binding site, the conformational space of each of the 10 ligands was investigated with Monte Carlo algorithm using 4 different solvent models. The energetically most favourable conformers of each ligand for each solvent model, as well as the cluster representatives obtained by cluster analysis, were used as starting structures for investigation of ligand binding into the PTAR binding site.

Resistance mechanisms of pathogenic bacteria are a growing issue for the application of macrolide antibiotics in clinical practice. One of the most common forms of resistance found in bacterial pathogens is dimethylation A2058 and A2058G substitution within 23S rRNA. Results obtained in the frame of this thesis suggest that ligand D effectively binds to PTAR regardless of the presence of dimethylated A2058. This means that ligand D could potentially be an efficient antibiotic compound even against strains that have developed resistance to dimethylation A2058. Furthermore, ligand D, in PTAR with dimethylated A2058, has lower binding energy than ligand D bound to the PTAR with non-methylated A2058. Effective binding of ligand D is caused primarily by the hydrophobic interactions between macrolactone ring with Lys 90, Lys 91, Arg 92 and A751. Since the exit channel of PTAR consists of mentioned amino acids and nucleotides, these interactions of ligand D might represent a potentially effective way of blocking the PTAR exit channel.

(88 pages, 34 figures, 8 tables, 42 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library, Faculty of Science – Department of Biology,
Marulićev trg 20, Zagreb

Keywords: antibiotic resistant bacteria, macrolides, molecular docking, Monte Carlo conformational search

Supervisor: Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor
Reviewers: Dr. sc. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor
Dr. sc. Branimir Bertoša, Associate Professor
Dr. sc. Martina Šeruga Musić, Associate Professor

Thesis accepted: 21.6.2018.

Sadržaj

1 Uvod.....	9
1.1 Funkcionalna građa ribosoma.....	9
1.2 Peptidil-transferazni centar i njegovo okruženje	11
1.3 Strukturna obilježja makrolida i mehanizam vezanja	13
1.4 Rezistencija na makrolide	15
1.5 Računalne metode strukturne biokemije.....	18
1.5.1 Polje sila.....	18
1.5.2 Optimizacija geometrije	20
1.5.3 Molekulsko uklapanje	20
1.5.4 Monte Carlo simulacije	22
1.6 Ciljevi istraživanja	23
2 Materijali i metode	25
2.1 Konformacijska pretraga liganada	25
2.2 Priprema ribosoma	28
2.3 Molekulsko uklapanje	29
2.4 Konformacijska pretraga ribosoma u PTAR-u bakterije <i>Escherichia coli</i>	30
3 Rezultati.....	32
3.1 Monte Carlo konformacijska pretraga liganada u različitim modelima otapala	32
3.1.1 Zastupljenost konformacija i intramolekulske vodikove veze	32
3.1.2 Intramolekulske π -interakcije	33
3.2 Rezultati simulacija vezanja liganada u peptidil-transferazni centar i okolnu regiju ribosoma ..	35
3.2.1 Energija vezanja liganada u PTAR ribosoma bakterije <i>Escherichia coli</i>	35
3.2.2 Intramolekulske π -interakcije liganada A, D i M u PTAR-u ribosoma bakterije <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.3 Vezanje liganada B, C, D, C, P i R u najuži dio izlaznog kanala PTAR-a bakterije <i>Escherichia coli</i>	41
3.2.4 Uloga funkcionalnih skupina liganada E, F i G prilikom vezanja u PTAR ribosoma bakterije <i>Escherichia coli</i>	47

3.2.5 Monte Carlo konformacijska pretraga liganada C*, D* i M* u PTAR-u ribosoma bakterije <i>Escherichia coli</i>	51
3.2.6 Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u PTAR-u s dimetiliranim A2058 23S rRNA ili u PTAR-u s A2058G mutacijom	56
4. Rasprava	68
4.1 Intramolekulske π -interakcije liganda	68
4.2 Utjecaj funkcionalnih skupina ribosoma na vezanje liganada	69
4.3 Ligandi u najužem dije lu izlaznog kanala PTAR-a	70
4.4 Utjecaj metilacije nukleotida A2058 23S rRNA i A2058G supstitucije na vezanje liganada A i C	71
4.5 Prijedlozi za daljnja istraživanja	73
5. Zaključak	75
6. Popis literature	76
7. Dodatak	80
7. Životopis	88

Popis kratica

RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
mRNA	messenger ribonucleic acid
tRNA	transfer ribonucleic acid
GTP	gvanozin-trifosfat
PRCG	Polak-Ribière conjugate gradient
TNCG	truncated-Newton conjugate-gradient
MCMM	Monte Carlo multiple-minima
PTC	peptidyl transferase center
PTAR	peptidyl transferase-associated region
RMSD	root mean square deviation

Napomena: Numeracija nukleotida i aminokiselina korištena u ovom radu označava numeraciju koja se koristi za opis biopolimera bakterije *Escherichia coli*, osim ako u tekstu nije naznačeno da se numeracija odnosi na neku drugu vrstu. Također, vodikove veze su na slikama prikazane crvenom iscrtkanom linijom, a π -interakcije plavom iscrtkanom linijom.

1 Uvod

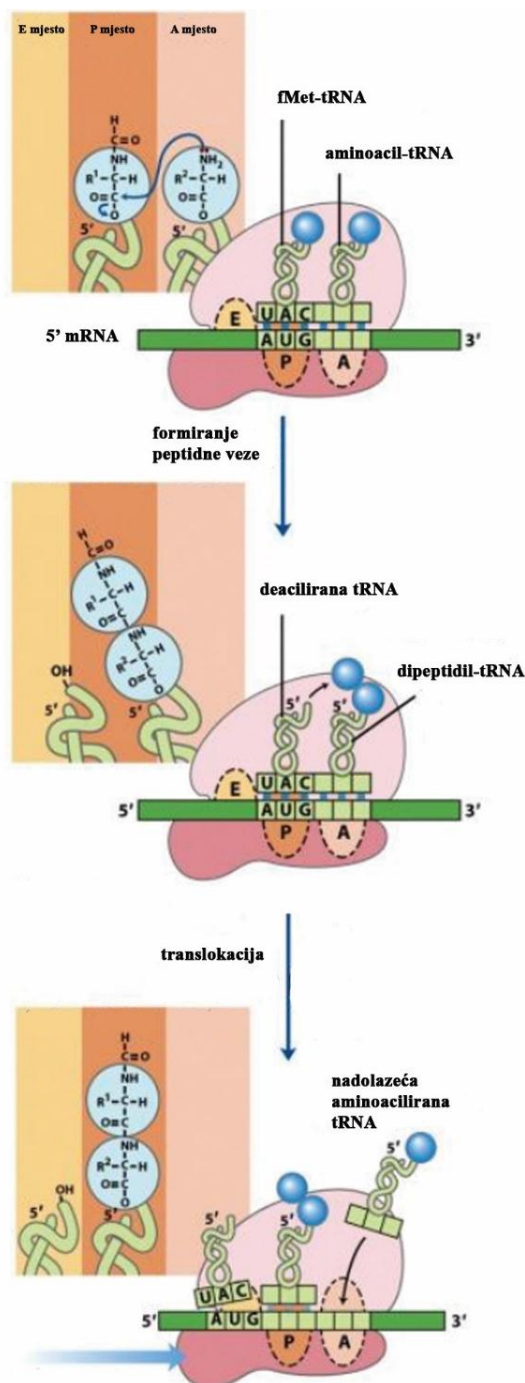
1.1 Funkcionalna građa ribosoma

Ribosomi su ribonukleoproteini čija je biološka funkcija translacija, odnosno sinteza polipeptida. Translacija na ribosomima zajedničko je obilježje svih živih bića, ali i virusa čiji se proteini sintetiziraju na ribosomima domaćina. Iako ribosome karakterizira visoka strukturna i funkcionalna evolucijska očuvanost, razlike u građi ribosoma postoje, kako među domenama živog svijeta, tako i među vrstama i sojevima. Ribosome je moguće odijeliti na osnovu sedimentacijskog koeficijenta na 70S ribosome koje nalazimo kod prokariota te u mitohondrijima i biljnim plastidima, i na 80S ribosome koji su locirani u citosolu te na endoplazmatskom retikulumu eukariotskih stanica (Lehninger i sur. 2000).

Ribosom koji je aktivan u translaciji sastoji se od male podjedinice (30S kod prokariota i 40S kod eukariota) te velike podjedinice (50S kod prokariota i 60S kod eukariota). Prokariotska mala ribosomska podjedinica sadrži 16S rRNA, dok eukariotska mala podjedinica sadrži 18S rRNA. Velika podjedinica prokariotskog ribosoma sadrži 5S i 23S rRNA, dok velika podjedinica eukariotskog ribosoma sadrži 5S, 28S i 5,8S rRNA. Prokariotski ribosom sadrži oko 55 proteina, dok ribosomi u citoplazmi eukariotskih stanica sadrže okvirno 82 proteina. U tijeku translacije dolazi do promjene proteinskog sastava ribosoma jer se fazno specifični proteini priključuju i isključuju iz ribosoma tijekom procesa translacije (Berg i sur. 2002).

Translacija počinje inicijacijom koja kod prokariota uključuje vezanje Shine-Dalgarnovog slijeda molekule mRNA na 3' kraj 16S rRNA male podjedinice prokariotskog ribosoma. Nukleotidi antikodona inicijatorske tRNA tvore vodikove veze s komplementarnim slijedom nukleotida na start kodonu mRNA čime nastaje 30S inicijatorski kompleks. Sljedeći korak je vezanje velike podjedinice ribosoma i inicijatorskog 30S kompleksa. Na granici dvije podjedinice pritom nastaju A (od engl. *aminoacyl*), P (od engl. *peptidyl*) i E (od engl. *exit*) mjesto. Tijekom elongacije aminoacilno (A) mjesto veže aminoaciliranu tRNA, peptidilno (P) mjesto veže peptidil-tRNA, a E mjesto veže deaciliranu tRNA prije njezinog otpuštanja (slika 1). Translokacija tRNA nakon stvaranja peptidne veze energetski je potpomognuta hidrolizom molekule GTP-a. Vezanjem faktora otpuštanja dolazi do terminacije translacije, hidrolize esterske veze između tRNA i peptida te disocijacije velike podjedinice, male podjedinice i

mRNA. Kod eukariota funkciju analognu prokariotskoj 16S rRNA ima 18S rRNA (Ramakrishnan 2002).



Slika 1. Shema stvaranja peptidne veze i translokacije u E, P i A mjestu prokariotskog ribosoma. Prije stvaranja peptidne veze tRNA kovalentno vezana s N-formilmetioninom nalazi se u P mjestu ribosoma dok se nadolazeća peptidil-tRNA nalazi u A mjestu. Uslijed pravilnog pozicioniranja oba supstrata dolazi do nukleofilnog napada na karbonilni ugljikov atom te stvaranja peptidne veze. Nakon translokacije peptidil-tRNA se nalazi u P mjestu dok na A mjesto dolazi nova aminoacilirana tRNA i ciklus se ponavlja dok se na ribosom ne vežu proteini koji potiču terminaciju translacije (slika preuzeta iz Lehninger i sur. 2000).

1.2 Peptidil-transferazni centar i njegovo okruženje

U peptidil-transferaznom centru (PTC) velike podjedinice ribosoma pravilnim pozicioniranjem supstrata dolazi do katalize stvaranja peptidne veze. U pravilnom smještaju peptidil-tRNA sudjeluju G2253 i G2252 23S rRNA koji stvaraju Watson-Crickove parove s C74 i C75 tRNA (tablica 1). Donorski supstrat pozicioniraju nukleotidi A2450-C2501, a u pozicioniranju akceptorskog supstrata sudjeluju nukleotidi U2506-G2583 (Samaha i sur. 1995).

Tablica 1. Položaj ključnih nukleotida koji grade PTAR i njihova pripadajuća funkcija. Prikazani nukleotidi su oni koje najčešće nalazimo na navedenim pozicijama 23S rRNA (Polancek i sur. 2008).

Položaj nukleotida u 23S rRNA	Funkcija nukleotida u PTC-u
A2058, A2059	sastavni dio ulaznog kanala PTAR-a
G2061, G2447	sudjeluje u mreži vodikovih veza koja orijentira A2451 rRNA
C2063	stvara bazni par s A2450 rRNA
G2251	stvara bazni par s C75 tRNA
G2252	stvara bazni par s C74 tRNA
A2450	sudjeluje u mreži vodikovih veza koja orijentira A2451, stvara bazni par sa C2063
A2451	N3 dušične baze i 2'OH riboze ovog nukleotida stvaraju vodikove veze s α -amino grupom aminoacil-tRNA (uklanjanje 2'OH inhibira transpeptidaciju)
U2585	drugi po redu najfleksibilniji nukleotidni ostatak u PTAR-u, 2'OH riboze ovog nukleotida tvori vodikove veze s A76 tRNA
A2062	najfleksibilniji nukleotidni ostatak u PTC-u, mutacija ove baze interferira s hidrolizom esterske veze peptidil-tRNA

Također, peptidil-transferazni centar katalizira hidrolizu esterske veze peptidil-tRNA. Erlacher i suradnici pokazali su kako A2062 23S rRNA ima ključnu ulogu u pozicioniranju molekule vode koja nukleofilno napada karbonilni ugljik esterske veze što dovodi do hidrolize veze. Supstitucija A2062C drastično smanjuje otpuštanje peptida iz aminoacilnog mjesta ribosoma (Erlacher i sur. 2005). Manji efekt na hidrolizu peptidil-tRNA imaju mutacije nukleotida C2063, A2451, U2585 i U2506 23S rRNA (Youngman i sur. 2004).

Ovaj katalitički centar građen je gotovo isključivo od 23S rRNA. Kako je kontaktna površina između podjedinica također većinski građena od ribonukleinskih kiselina, ribosom možemo smatrati ribozimom. Rastući polipeptidni lanac svojim amino-krajem prolazi od peptidil-transferaznog centra kroz izlazni kanal koji se nastavlja na peptidil-transferazni centar (Ban i sur 2000). Peptidil-transferazni centar te regija koja okružuje ulaz u izlazni kanal zove se regija asociirana s peptidil-transferaznim centrom (PTAR od engl. *Peptidyl transferase-associated region*) (Schlunzen i sur. 2003).

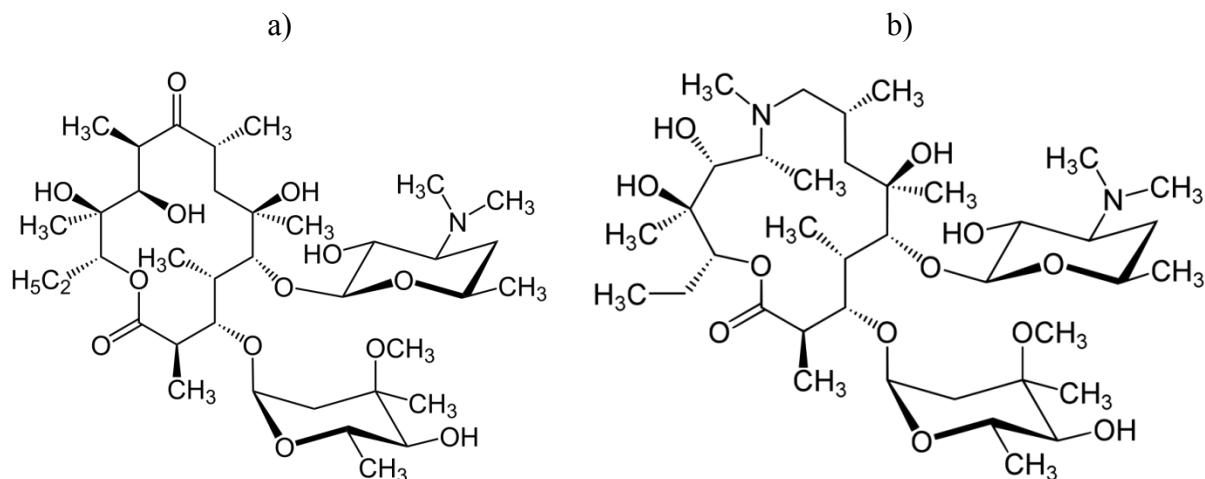
Primarni slijed 23S rRNA koja gradi PTAR evolucijski je visoko konzerviran. Ova pojava omogućuje primjenu jedne strukturne varijante antibiotika na širok spektar bakterijskih vrsta i sojeva. Istovremeno mala varijabilnost u građi PTAR-a otežava pronalazak dovoljno specifičnih antibiotika s niskim afinitetom vezanja u PTAR humanih ribosoma. Primarni mehanizam na kojem je temeljena selektivnost makrolidnih antibiotika je specifično stvaranje vodikovih veza između A2058 23S rRNA i hidroksilne skupine dezoamidnog šećera makrolidnog prstena. Ovakav tip vezanja nije moguć ukoliko je na ekvivalentnoj poziciji neka druga dušikova baza. Dok se kod bakterija na ovoj ključnoj poziciji nalazi adenzinska baza, kod arhea i eukariota ovdje nalazimo gvanozin. Odsustvo adenozina na poziciji 2058 23S rRNA uvelike smanjuje afinitet vezanja makrolida u PTAR (Birte i sur 2001). Drugi mehanizam za koji se vjeruje da utječe na selektivnost makrolida prema bakterijskim ribosomima je suženje izlaznog kanala udaljenog ~30 Å od PTC-a. Kod bakterijskih organizama suženje grade proteini L4 i L22. Eukariotski ekvivalent proteina L4 sadrži aminokiselinsku inserciju koja sužava prolaz kroz izlazni kanal što onemogućuje ulazak makrolida u PTAR te pospješuje selektivnost vezanja makrolida u prokariotske ribosome (Melnikov i sur. 2012).

Unatoč napretku metoda korištenih za strukturnu analizu biomolekula, opisivanje prostornog rasporeda atoma velikih makromolekulskih sustava još je uvijek izazov strukturne biologije. Ribosomi organizama *Haloarcula marismortui*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermus thermophilus* i *Escherichia coli* su zbog visoke rezolucije dostupnih struktura često su korišteni u *in silico* istraživanjima (Sherer 2010). *Escherichia coli* je gram-negativna bakterija koja nastanjuje probavni sustav toplokrvnih životinja te u uvjetima homeostaze predstavlja važnog simbionta. Jedan je od najčešćih modelnih organizama u molekularnoj biologiji. Kako dijeli evolucijsku srodnost s patogenima kao što su *Klebsiella*, *Salmonella* i *Shigella* važan je sustav za istraživanje antimikrobioloških učinaka antibiotika (Hufnagel i sur. 2015).

1.3 Strukturna obilježja makrolidi i mehanizam vezanja

Makrolidi su grupa antibiotika koji se selektivno vežu u izlazni kanal PTAR-a prokariotskih ribosoma te inhibiraju translaciju tako što sprečavaju izlazak amino-kraja sintetiziranog peptida kroz izlazni kanal, što dovodi do prestanka elongacije, a ovisno o vrsti makrolidnog inhibitora, i do disocijacije ribosomskog kompleksa. U širem kontekstu makrolidi obuhvaćaju antibiotike čija je baza 14-člani, 15-člani ili 16-člani laktonski prsten na koji su vezani različiti supstituenti (najčešće dva monosaharida). Makrolide općenito možemo podijeliti na makrolide u užem smislu, ketolide i azalide (Birte i sur. 2001).

Eritromicin možemo ubrojiti u makrolid u užem smislu riječi i jedan je od prvih makrolidnih antibiotika koji je ušao u kliničku upotrebu. Metabolit je bakterije *Streptomyces erythreus* kojoj osigurava selektivnu prednost inhibirajući ostale pripadnike mikrobiološke zajednice (Oliynyk i sur. 2007). Sastoji se od 14-članog makrolaktonskog prstena, kladinoze spojene eterskom vezom s atomom C3 makrolaktonskog prstena i dezoamina spojenog eterskom vezom s atomom C5 makrolaktonskog prstena (slika 2a). Dunkle i suradnici pokazali su da u PTC-u bakterije *Escherichia coli* dezoamin eritromicina putem hidroksidne skupine tvori vodikove veze s N1 A2058 23S rRNA, dok se hidrofobni dio makrolaktonskog prstena putem van der Waalsovih interakcija veže na G2057 i C2611 (Dunkle i sur. 2010). Bulkley i suradnici su pokazali kako vezanje dezoamina eritromicina uzrokuje rotaciju A2062 23S rRNA, nukleotida koji sudjeluje u terminaciji translacije (Bulkley i sur 2010).



Slika 2. Strukturni prikaz: a) eritromicina i b) azitromicina.

Ketolidi su strukturne izvedenice eritromicina gdje je kladinoza vezana na C3 atom laktonskog prstena zamijenjena keto skupinom. Kako bi se nadoknadio entalpijski doprinos vezanja kladinoze, ketolidi su često supstituirani skupinama koji doprinose smanjenju slobodne energije sustava. Azalidi su semisintetički derivati eritromicina kojima je u makrolaktonski prsten dodan metilirani dušik čime je sam makrolitički prsten postao 15-člani. Uvođenjem dušika u sastav prstena povećana je bazičnost, a skupa s njom i stabilnost te biodostupnost molekule. Primjer azalida je azitromicin (Schlunzen i sur. 2003).

Schlunzen i suradnici su na primjeru ribosoma *Deinococcus radiodurans* rentgenskom strukturnom analizom pokazali kako azitromicin (slika 2b) posjeduje dva vezna mjesta u PTAR-u, te kako se u oba mjesta veže simultano i potencijalno synergistički. Prvi način vezanja azitromicina nalikuje načinu vezanja eritromicina. Međutim, za razliku od vezanja eritromicina, prilikom vezanja azitromicina postoji dodatni hidrofobni doprinos uzrokovan vezanjem azitromicina na A2062 i U2690 te doprinos stvaranja vodikovih veza između kladinoze i U2586. Prvi način vezanja azitromicina u kontaktu je s domenama IV i V 23S rRNA. Drugi način vezanja dodatno reagira s domenom II 23S rRNA te s proteinima koji grade suženje izlaznog kanala L4 i L22 (Schlunzen i sur. 2003). Međutim, rezultati kinetičkih istraživanja vezanja azitromicina u PTC *Escherichia coli* te saznanje da se azitromicin na L4 protein *Deinococcus radiodurans* veže putem aminokiselinskog ostatka specifičnog za tu vrstu, upućuje kako je drugo vezno mjesto azitromicina vjerojatno specifično za *Deinococcus radiodurans* (Bulkley i sur 2010).

1.4 Rezistencija na makrolide

Makrolidni antibiotici uspješno se primjenjuju se u liječenju bakterijskih infekcija od njihovog otkrića 50-ih godina prošlog stoljeća. Eritromicin se i danas koristi kao zamjena za penicilin u svrhu liječenja infekcija uzrokovanih streptokokima osoba alergičnih na penicilin, a azitromicin služi za tretiranje respiratornih, dermatoloških i urogenitalnih bakterijskih infekcija (Parnham i sur. 2014.). Nažalost, učinkovitost klinički korištenih makrolida pada zbog pojave rezistentnih bakterijskih sojeva (Morozumi i sur. 2010). Rezistentni bakterijski sojevi javljaju se uslijed prekomjerne upotrebe antibiotika kada zbog selektivnog pritiska evolucijsku prednost imaju bakterije koje su razvile rezistencijske mehanizme. Kemijska razgradnja, adiranje kemijskih grupa koji sprječavaju vezanje u aktivno mjesto te iznošenje aktivne tvari iz stanice putem membranskih kanala samo su neki od mnogobrojnih bakterijskih rezistencijskih mehanizama (Birte i sur. 2001).

Rezistencija na eritromicin prvi put je primijećena kod bakterije *Staphylococcus aureus* nakon što su bakterijske stanice bile izložene visokoj količini eritromicina. Sojevi koji su bili tretirani eritromicinom pokazivali su rezistenciju na linkozamide te streptogramin B, i obrnuto, sojevi tretirani linkozamidima i streptograminom B pokazivali su rezistenciju prema makrolidima. Takve sojeve odlikuje takozvani MLS_B fenotip koji nije karakterističan samo za *Staphylococcus aureus* već je pronađen kod mnogih sojeva gram-pozitivnih, a rjeđe i gram-negativnih bakterija (Weisblum 1998).

Jedan od genotipa koji kao rezultat daje MLS_B fenotip karakteriziran je prisutnošću gena *erm* koji kodiraju za 23S rRNA specifične metiltransferaze. Inducirana ekspresija ovog enzima rezultira metilacijom N1dušične baze A2058 23S rRNA što sprečava stvaranje vodikove veze između dušika baze i hidroksilne skupine dezoamidnog šećera eritromicina te onemogućuje vezanje laktonskog prstena na hidrofobnu površinu PTAR-a. Baza A2058 može biti monometilirana ili dimetilirana. Monometilirana forma u maloj mjeri doprinosi rezistentnom efektu, dok dimetilirana forma gotovo u potpunosti sprječava vezanje eritromicina u PTAR prokariota s MLS_B fenotipom. Do danas je opisano više izoformi ovih enzima čiji su geni uglavnom prisutni u plazmidima (Birte i sur. 2001).

Pokazano je da supstituiranje na laktonski prsten vezane kladinoze s karbonilnim kisikom uvelike smanjuje induciranje ekspresije metiltransferaza Erm prilikom vezanja makrolida u PTAR. S ciljem izbjegavanja induktivnog utjecaja makrolida, opisanom supstitucijom dobivena je nova klasa makrolida pod nazivom ketolidi (Dunkle i sur. 2010).

Ketolid ABT-773 kojeg su opisali Schlünzen i suradnici stoga ima izražen antimikrobni učinak i kod sojeva koji posjeduju erm gene (Bonnefoy i sur. 1997).

Nažalost, novi rezistencijski mehanizmi koji ometaju vezanje ketolida u PTAR primijećeni su kod *Escherichiae coli* gdje je uslijed ekspresije specifičnih pentapeptida zabilježeno smanjenje afiniteta vezanja ketolida u PTAR (Birte i sur. 2001). Također, metilacija dušika na A2058 nije jedina metoda kojom rezistentni sojevi sprečavaju vezanje makrolida u PTAR. Supstitucija A2058G najčešća je mutacija koju nalazimo kod bakterija rezistentnih na makrolide (Dunkle i sur. 2010). Ova zamjena onemogućuje stvaranje vodikovih veza između dušikove baze i dezoamina te zbog steričkih smetnji otežava stvaranje van der Waalsovih interakcija između makrolaktonskog prstena i hidrofobne površine koju tvore G2057 i C2611 (Tu i sur. 2005). S obzirom na to da kod eukariotskih citoplazmatskih i mitohondrijskih ribosoma na poziciji koja odgovara A2058 bakterije *Escherichiae coli* nalazimo gvanozinski ostatak, razvoj makrolidnih antibiotika koji bi se selektivno vezali u PTAR patogena sa A2058G supstitucijom znatno je otežan (Birte i sur. 2001).

Mutacije 23S rRNA na pozicijama 754, 2057, 2059, 2609, 2611 i 2610 (tablica 2) se također smanjuju efektivnu inhibiciju translacije makrolidima, iako je utjecaj ovih supstitucija na smanjenje afiniteta vezanja makrolida u PTAR mnogo manji nego što je zabilježeno u slučaju A2058G supstitucija (Dunkle i sur. 2010). Mutacije proteina L4 i L22 velike podjedinice ribosoma rezistentnih sojeva bakterije *Streptococcus pneumoniae* uzrokuju strukturnu promjenu PTAR-a koja ne utječe na efikasnost translacije, a onemogućuje efektivno vezanje eritromicina (Gregory i sur. 1999). Iako omjer mase RNA naprema masi proteina u ribosomima varira od 2:1 u slučaju prokariotskih, do 1:4 u slučaju mitohondrijskih ribosoma (Lehninger i sur. 2000), prilikom dizajna novih makrolida osim strukturnih karakteristika rRNA važno je kritički razmotriti ulogu proteina PTAR-a prilikom dizajna novih makrolidnih antibiotika.

Tablica 2. Supstitucije koje uzrokuju rezistenciju na makrolide i ostale antibiotike koji se vežu u PTAR.

Pozicija nukleotida u 23S rRNA <i>E.coli</i> ^a	Organizam	Nukleotidi		Fenotip
		divlji tip	mutant	
754	<i>Escherichia coli</i>	U	A	Ery
2057	<i>Escherichia coli</i>	G	A	Ery
2057	<i>Escherichia coli</i>	G+G	A+A	Ery Lin
2032	<i>Helicobacter pylori</i>	A+G	G+A	Azm Ery
2058	<i>Escherichia coli</i>	A	G	Ery Lin
		A	U	MLS _B Mac Lin
	<i>Helicobacter pylori</i>	A	G	Mac
		A	U	MLS _B
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	A	G	Ery Lin
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	A	G	MLS _B
2059	<i>Helicobacter pylori</i>	A	C	Mac Lin
		A	G	Mac Lin
	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	A	C	Azm
	<i>Mycobacterium avium</i>	A	C	Azm
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	A	G	Ery Lin
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	A	G	Mac
	<i>Propionibacteria</i>	A	G	Mac Lin
2611	<i>Escherichia coli</i>	C	U	Ery
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	C	A, G	Mac

^aNumeracija nukleotida je bazirana na numeraciji nukleotida bakterije *E.coli*. Ery označava fenotip rezistentan na eritromicin, Lin na linkozamide, Azm na azitromicin, Mac na makrolide u širem smislu te MLS_B na eritromicin linkozamide i streptogramin B (Birte i sur. 2001).

1.5 Računalne metode strukturne biokemiji

1.5.1 Polje sila

Računalne metode za izračun potencijalne energije kemijskih sustava možemo podijeliti na kvantno-mehaničke i empirijske metode. Kvantno-mehaničke metode eksplicitno uzimaju u obzir i elektrone, a ukupna energija sustava računa se rješavanjem Schrödingrove jednačbe. Empirijske metode, za razliku od kvantno-mehaničkih, ne uzimaju eksplicitno u obzir elektrone, već implicitno uračunavaju energetski doprinos koji nastaje uslijed elektronske strukture atoma i molekula. Načelno se kvantno-mehaničkim metodama može točnije opisati kemijski sustav, međutim, one zahtijevaju znatno više računalnih resursa te se, usprkos obećavajućem napretku računalnih sustava, ne mogu primijeniti za potpun opis bioloških makromolekula.

Empirijske metode su temeljene na polju sila koje karakterizira funkcional i pripadajući skup parametara. Funkcional predstavlja skup funkcija koje se koriste prilikom izračuna potencijalne energije sustava koja ovisi o konformaciji promatrane molekule. Formula (1) predstavlja funkcional OPLS-AA polja sila (Jorgensen i sur. 1996).

$$V = \sum_{ij}^{veze} k_{l,ij} (l_{ij} - l_{0,ij}) + \sum_{ijk}^{kutevi} k_{\theta,ijk} (\theta_{ijk} - \theta_{0,ijk}) + \sum_{ijkl}^{dihedralni} \sum_{m=1}^4 V_{m,ijkl} [1 - (-1)^m \cos m\Phi_{ijkl}] + \sum_{ijkl}^{nepravilni} k_{\chi,ijk} (\chi_{ijkl} - \chi_{0,ijkl}) + \sum_{i<j}^{nevezne} f_{ij} \left\{ 4\epsilon_{ij} \left[\frac{\sigma_{ij}^{12}}{r_{ij}} - \frac{\sigma_{ij}^6}{r_{ij}} \right] + \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \right\} \quad (1)$$

Prvi pribrojnik u prikazanom funkcionalu (1) predstavlja energetski doprinos istezanja veza ukupnoj energiji sustava. U ovom slučaju energija vezanja je aproksimirana modelom harmoničkog oscilatora gdje $k_{l,ij}$ predstavlja konstantu istezanja veze, l_{ij} označava udaljenost među jezgama dvaju atoma u nekoj konformaciji, a $l_{0,ij}$ označava tu istu udaljenost za koju je parametrizirano da je energija veze optimalna. Drugi član u izrazu predstavlja energiju savijanja kuteva koja ovisi o konstanti savijanja kuta ($k_{\theta,ijk}$), kutu koji čine tri atoma u promatranoj konformaciji (θ_{ijk}) te kutu između tri atoma koji karakterizira najniža energija ($\theta_{0,ijk}$). Treći pribrojnik opisuje energetski doprinos dihedrlnih kuteva koji se može izračunati iz prostornog rasporeda četiri atoma. Četvrti član u izrazu poprima pozitivnu vrijednost ako u

konformaciji postoji prostorni raspored atoma koji nije karakterističan za realne kemijske sustave. Postojanje tog člana uvjetovano je upravo činjenicom da se elektroni ne uzimaju u obzir eksplicitno prilikom opisivanja sustava.

Ukupnoj potencijalnoj energiji sustava potrebno je pribrojiti i nevezne članove koji uključuju energiju van der Waalsovih interakcija i energiju elektrostatskih interakcija između eksplicitnih naboja. Energija Van der Waalsovih interakcija opisana je Lennard-Jonesovim potencijalom, dok je energija interakcije između eksplicitnih naboja opisana Coulonovom jednadžbom. Biomakromolekule karakterizira velik broj potencijalnih konformacija. Smatanje proteina u funkcionalnu trodimenzionalnu strukturu popraćeno je promjenama u nekovalentnim oblicima vezanja te je zato prilikom razvoja polja sila važno dobro okarakterizirati nevezne članove (šesti član).

Osim funkcionala, važan sastavni dio svakog polja sila su parametri koji su konstante za to određeno polje sila. U parametre ubrajamo veličine kao što su duljina veze između dva atoma u minimumu potencijalne energije ili kut između tri atoma koji odgovara energetske minimumu tog sustava. Energetske minimume veza i kuteva između istih atoma u različitim sustavima karakteriziraju iste duljine veza i iste vrijednosti kuteva što upućuje na važnost prenosivosti parametara. S obzirom na prenosivost i kvalitetu parametara, polja sila dijelimo na opća i specijalizirana. Opća polja sila moguće je primijeniti za analizu raznih sustava, uključujući male organske molekule, mineralne kristalne sustave, proteine te nukleinske kiseline itd. Nedostatak općih polja sila je obično veća nepreciznost u odnosu na specijalizirana polja sila. Preciznost je osobito važna kod velikih biofizikalnih/biokemijskih sustava jer je razlika u energiji između dva termodinamička stanja sustava veoma mala, a uzrokovana je velikim brojem interakcija. Iz tog se razloga u računalnim simulacijama biokemijskih sustava uglavnom koriste specijalizirana polja sila.

Funkcional OPLS_2005 polje sila (Banks i sur. 2005) baziran je na funkcionalu iz OPLS-AA polje sila (Jorgensen i sur. 1996). Parametri neveznih interakcija također su preuzeti iz OPLS-AA polje sila, ali su uvedeni i novi parametri za opis energetskog doprinosa istezanja kovalentnih veza te međuveznih i dihedralnih kuteva. Spomenuti parametri dobiveni su eksperimentalno iz skupa od 112 organskih molekula ili kvantno-kemijskim izračunima (Shivakumar i sur. 2010). Ovo polje sila posebno dobro opisuje termodinamička svojstva malih organskih molekula okruženih otapalom, ali i proteinskih sustava zbog čega je dobar odabir prilikom istraživanja kompleksa malih organskih molekula i biomakromolekula (Jorgensen i sur. 1996).

1.5.2 Optimizacija geometrije

Ploha potencijalne energije je $3N-5$ dimenzionalni prostor u kojem je svakom mogućem stanju sustava pripisana potencijalna energija izračunata s pomoću polja sila. Pronalaženje ekstrema na plohi potencijalne energije najčešće je primarna funkcija metoda baziranih na polju sila. Metode koje pronalaze najbliži susjedni, lokalni ekstrem sustava u odnosu na početno stanje sustava nazivaju se optimizacijske metode i uglavnom se koriste za pronalaženje lokalnih minimuma.

Optimizacijski algoritmi dijele se na one koji koriste i one koji ne koriste gradijent funkcije u procesu optimizacije geometrije. Metode koje koriste gradijent su preciznije u pronalaženju lokalnog minimuma, a klasificirane su s obzirom na najviši red derivacije koji koriste. Metoda konjugiranih gradijenta po Polaku i Ribieru (engl. *Polak-Ribière conjugate gradient* ili PRCG) primjer je metode prvog reda, dok je modifikacija Newtonove metode (engl. *truncated-Newton conjugate-gradient* ili TNCG) primjer metode drugog reda. Metode prvog reda su robusnije i brzo pronalaze približne argumente funkcije koji odgovaraju blizini lokalnog minimuma, dok su metode drugog reda preciznije, no vremenski zahtjevnije. Dobra je praksa kombinirati obje metode tako da se u prvoj fazi optimizacije koriste metode prvog, a u drugoj fazi metode drugog reda.

1.5.3 Molekulsko uklapanje

Molekulsko uklapanje (engl. *molecular docking*) je metoda namijenjena za brzu pretragu načina vezanja liganda i receptora. Proces je baziran na generiranju trodimenzionalne mreže (engl. *grid*) prilikom čega se svakoj točki mreže pripisuju kemijska svojstva s pomoću kojih se računa vezna energija liganda u tako priređenoj mreži. Broj točaka u mreži se definira prije generiranja mreže i svaka točka odgovara definiranoj poziciji u receptoru. Za svaki tip atoma koji nalazimo u ligandu točki se pripisuju energija interakcije, elektrostatski potencijal i desolvacijski potencijal. Te vrijednosti se računaju tako što se pojedinačni atom koji odgovara nekom od tipova atoma prisutnih u ligandu dovede na poziciju u receptoru koji odgovara koordinatama te određene točke te mu se izračunaju i pripišu spomenute vrijednosti. Kasnije se te iste vrijednosti koriste prilikom računanja energije vezanja liganda. Nakon generiranja mreže se s pomoću algoritama sadržanih u programskom paketu Autodock

(Morris i sur. 2009) generiraju različite konformacije ispitivanog liganda za koje se na osnovu polja sila (2) procjenjuje slobodna energija vezanja:

$$\Delta G = (V_{vezani}^{L-L} - V_{nevezani}^{L-L}) + (V_{vezani}^{P-P} - V_{nevezani}^{P-P}) + (V_{vezani}^{P-L} - V_{nevezani}^{P-L} + \Delta S_{konf})$$

(2)

Slobodna energija vezanja zbroj je entalpijskih i entropijskih doprinosa. U metodama molekuskog uklapanja entalpijski doprinos je zbroj energetskih doprinosa disperznih i van der Waalsovih interakcija, vodikovih veza, Coulombove interakcija te entalpije desolvatacije. Za izračun disperznih i van der Waalsovih interakcija koriste se parametri iz Amber polja sila (Cornell i sur. 1995), a entalpija solvatacije izračunava se iz volumena okolnih atoma, njihove udaljenosti i parametara karakterističnih za tip atoma koji se nalazi u promatranoj točki.

Za razliku od mnogih drugih empirijskih metoda funkcional polja sila koji koristi Autodock 4 (Morris i sur. 2009) ima zasebnu funkciju za izračun energetskog doprinosa vodikovih veza ukupnoj energiji sustava. Taj entalpijski doprinos ovisi o duljini, ali i kutu koji tvori vodikova veza. Vodikove veze posjeduju svojstva koja dijele s kovalentnim i nekovalentnim interakcijama, a u biološkim sustavima imaju bitnu ulogu u stvaranju sekundarnih i tercijarnih struktura bioloških makromolekula, procesima prepoznavanja vezanih partnera u biološkim sustavima, u kataliziranju enzimskih reakcija i mnogim drugim. Energija vodikovih veza, osim o udaljenosti, veoma ovisi i o kutu vezanja. Entalpijski doprinos vodikovih veza ukupnoj energiji makromolekuskog sustava u pravilu je po iznosu manji nego ukupni doprinos van der Waalsovih interakcija. Unatoč tome, zbog ovisnosti energije veze o kutu, vodikove veze uvelike utječu na specifičnost vezanja što ih čini veoma bitnim faktorom koji treba uzet u obzir prilikom termodinamičkog opisa kompleksa makromolekule i liganda (Rowe i sur. 2017).

1.5.4 Monte Carlo simulacije

Metode bazirane na rješavanju Newtonovih jednažbi gibanja, poput molekulske dinamike, adekvatno opisuju konformacijske promjene sustava u željenom vremenskom intervalu, međutim, biomakromolekule zbog velikog broja internih koordinata imaju izuzetno kompleksnu plohu potencijalne energije te metode molekulske dinamike ponekad nisu dostatne za brzu i opsežnu konformacijsku pretragu. Monte Carlo simulacije su računalne metode koje nasumičnim odabirom varijabli rješavaju determinističke probleme bazirane na distribuciji vjerojatnosti.

Jedan takav algoritam je Monte Carlo Multiple Minima (MCMM) iz programskog paketa Schrödinger (Schrödinger, LLC, New York, 2018) koji tijekom pretrage nasumično mijenja rotabilne veze, optimizira geometriju te odabire početnu konformaciju za sljedeći Monte Carlo korak. Tijekom pretrage, osim iznosa dihedalnog kuta može varirati i broj kuteva čija se vrijednost mijenja tijekom jednog koraka. Početna konformacija može biti posljednja pronađena struktura, struktura s najmanjom potencijalnom energijom ili struktura odabrana s obzirom na neki drugi kriterij. Ukoliko se kao početna struktura koristi struktura najniže energije povećava se vjerojatnost da nova struktura također ima malu potencijalnu energiju. Nedostatak ovog pristupa je mogućnost da po završetku pretrage struktura s najmanjom energijom ne predstavlja globalni već lokalni minimum plohe potencijalne energije. Početne strukture moguće je odabrati i kombinacijom dviju metoda.

Monte Carlo metode pretražuju višedimenzionalne plohe potencijalne energije uz mali računalni utrošak što ih čini idealnima za procjenu jačine vezanja liganda u ciljane regije makromolekula. Dok je preciznost većine programa razvijenih za provođenje simulacija molekulskog uklapanja upitna ukoliko je receptor nukleinska kiselina (de Vaca i sur. 2015), broj Monte Carlo algoritama namijenjenih istraživanju vezanja malih organskih molekula na nukleinske kiseline raste (Rohs i sur. 2005). Međutim, stohastička priroda Monte Carlo metoda povlači i određena ograničenja, te metoda nije optimalni odabir za istraživanje dinamičkog ponašanja makromolekulskih sustava.

1.6 Ciljevi istraživanja

Rezultati rentgenske strukturne analize PTAR-a velike podjedinice prokariotskih ribosoma ukazuju da je vezanje makrolaktonskog prstena na hidrofobnu površinu koju čine G2057 i C2611 23S rRNA prisutno u gotovo svim do sad istraženim kompleksima prokariotskih ribosoma i makrolida. Supstituenti makrolaktonskog prstena često su nositelji polarnih skupina te ovisno o vrsti i mjestu vezanja mogu biti donori ili akceptori vodikove veze (Sherer i sur. 2010). Hidroksidna skupina dezoamina tvori vodikovu vezu s N1 atomom A2058 23S rRNA, no nažalost, metilacijom ili supstitucijom ovog nukleotida sprječava se vezanje makrolida u PTAR.

Računalne simulacije istražuju mikroskopsko stanje sustava te se izvrsno nadopunjuju s eksperimentalnim biokemijskim metodama koje se koriste za makroskopsku karakterizaciju tog istog sustava. Simulacijama vezanja liganada i biomakromolekula moguće je dobiti bolji uvid u molekularne interakcije receptora i liganda. Računalnim se metodama može procijeniti afinitet vezanja liganda na receptor što olakšava postavljanje prioriteta prilikom razvoja farmakološki aktivnih tvari.

Cilj ovog diplomskog rada je opis vezanja novih strukturnih oblika makrolida u PTAR velike podjedinice ribosoma bakterije *Escherichiae coli*. U tu svrhu osmišljeno je 10 novih molekula čija je struktura bazirana na strukturnim karakteristikama azitromicina. Većina predloženih struktura razlikuje se od azitromicina po supstituentima vezanim na N10 atom makrolaktonskog prstena, a jedan od derivata umjesto kladinoze na C3 atom laktonskog prstena ima vezan karbonilni kisik. Svi supstituenti sadrže jedan ili dva aromatska prstena čija polarnost varira ovisno o kemijskim skupinama vezanim na aromatski prsten. Strukture nekih supstituenata dodatno sadrže purinske ili pirimidinske baze koje imaju potencijal za stvaranje Watson-Crickovih parova te mogu tvoriti interakcije naslagivanja (engl. *stacking interactions*).

Upotrebom konformacijske pretrage temeljene na Monte Carlo algoritmu uz korištenje različita modela otapala, 10 novih strukturnih varijanti makrolida podvrgnuti su konformacijskoj pretrazi, a dobivene konformacije su potom grupirane s obzirom na srednji korijen kvadrata odstupanja (engl. *root mean square deviation* ili RMSD). Strukture koje najbolje opisuju geometriju svake od grupa su zajedno s konformacijama najniže energije korištene kao početne strukture u simulacijama molekulskog uklapanja koje su provedene pomoću programskog paketa Autodock 4 (Morris i sur. 2009). Izlazne konformacije najniže

energije i konformacije čiji bi načini vezanja potencijalno mogli biti očuvani unatoč djelovanju bakterijskih rezistencijskih mehanizama poslužile su kao ulazne strukture za Monte Carlo konformacijsku pretragu liganda u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*. Također, za ligande koji se u PTAR vežu na način za koji je pretpostavljeno da bi bio očuvan i u prisutnosti dimetiliranog A2058 provedena je dodatna Monte Carlo konformacijska pretraga liganda vezanog u PTAR ribosoma s dimetiliranim A2058. Ukoliko je procijenjeno da bi ligand ostao vezan u PTAR uslijed A2058G supstitucije Monte Carlo konformacijska pretraga je provedena i unutar PTAR-a s A2058G mutacijom.

Očekivano je da će se makrolaktonski prsten azitromicinskih derivata u PTAR ribosoma *Escherichiae coli* vezati na sličan način kao što se azitromicin veže u PTAR bakterije *Deinococcus radiodurans* (Schlunzen i sur. 2003). Također, pretpostavka je da će aromatski sustavi supstituenta vezanih na N10 laktonskog prstena pogodovati stvaranju interakcija naslagivanja između aromatskih prstena i dušičnih baza 23S rRNA. Polarne skupine koje su vezane na benzenski prsten bi zbog potencijala za stvaranje vodikovih veza mogle umanjiti mogućnost nespecifičnog vezanja supstituenta u PTAR-u. Za kraj, dušične baze koje su u sastavu nekih od liganada mogle bi stvarati Watson-Crickove parove baza kao i interakcije naslagivanja s nukleotidima koji grade 23S rRNA.

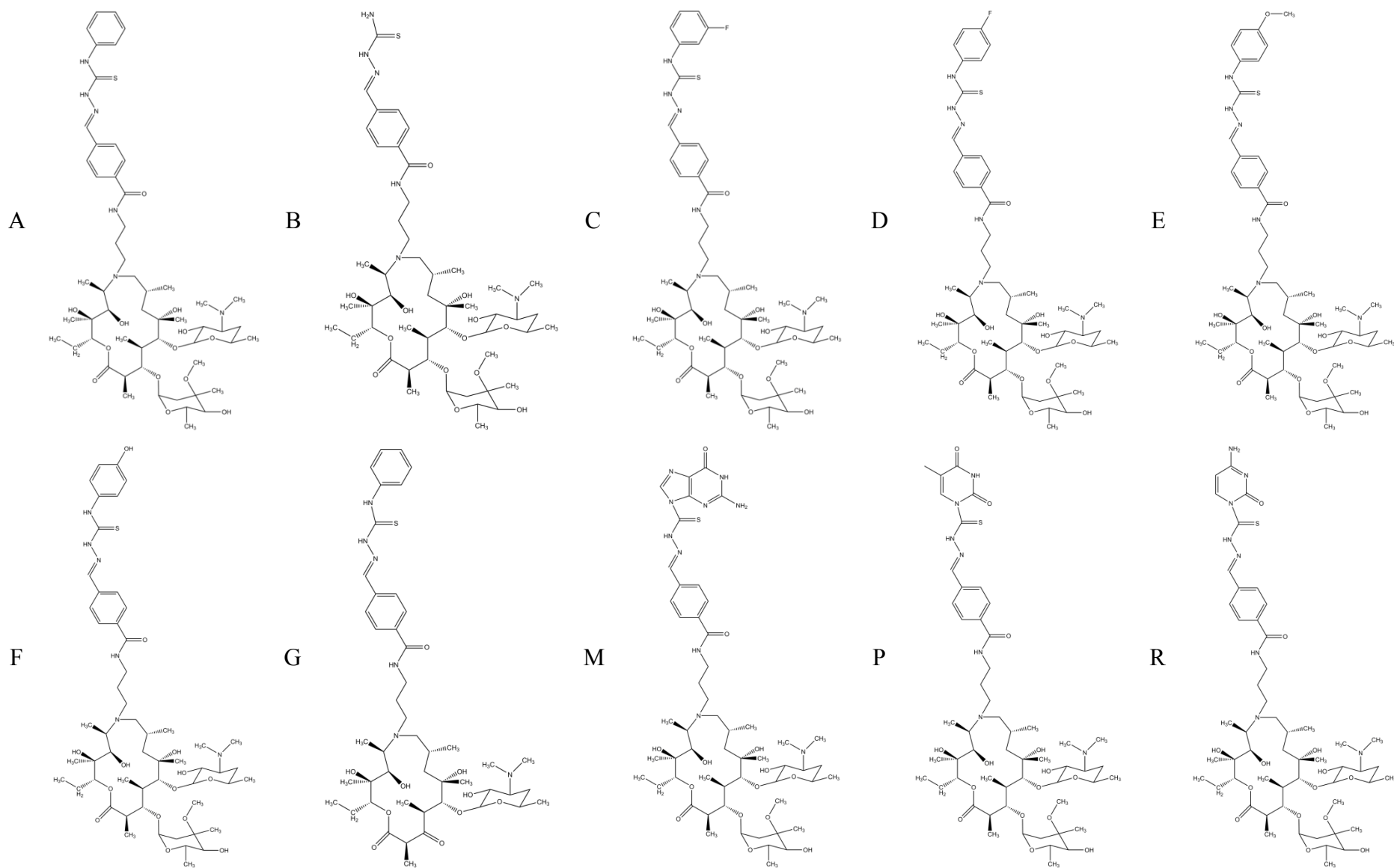
2 Materijali i metode

2.1 Konformacijska pretraga liganada

Liganadi čije je vezanje istraživano u sklopu ovog diplomskog rada označeni su kao ligandi A-R (ligA – ligR) i prikazani su na slici 3. Strukture azitromicina i eritromicina korištene su za kontrolne simulacije te su podvrgnute svim postupcima kao i predloženi azitromicinski derivati, odnosno ligandi A-R.

Početna struktura svakog liganda konstruirana je s pomoću programa Avogadro (v.1.0.1) (Hanwell i sur. 2012) nakon čega su geometrije optimizirane poljem sila GAFF koje se često upotrebljava za optimizaciju organskih molekula korištenih u farmakološke svrhe (Wang i sur. 2006). Tako pripremljene strukture korištene su u konformacijskoj pretrazi koja je provedena s pomoću programa MacroModel (Schrödinger, LLC, New York, 2018). U svrhu efikasnog pretraživanja konformacijskog prostora, korišten je Monte Carlo Multiple Minima algoritam (MCOMM) pri čemu je odabrana opcija koja omogućuje rotaciju amidnih, esterskih i azo veza. Pored toga, odabrano je da se enantiomeri dobiveni pretragom zadržavaju kao posebni konformer.

Polje sila koje je korišteno tijekom pretrage je OPLS_2005 (Banks i sur. 2005). Korišteni modeli otapala su implicitni model vode, implicitni model oktanola, kontinuirani medij dielektrične konstante 4 (modelira dielektričnu konstantu veznog mjesta) i kontinuirani medij dielektrične konstante 81 (modelira dielektričnu konstantu citoplazme). Konformacijski prostor svakog liganda pretražen je uz korištenje svakog od navedenih modela otapala.



Slika 3. Dvodimenzionalni prikaz struktura liganada koji su korišteni tijekom računalnog istraživanja.

Udaljenost unutar koje se računa entalpijski doprinos potencijalnoj energiji sustava (engl. *cut off*) za van der Waalove interakcije i elektrostatske interakcije iznosio je 8 Å, a za vodikove veze ta udaljenost iznosila je 4 Å. Za sve strukture najveći broj koraka pretrage iznosio je 50 000, dok je za svaku rotabilnu vezu korišteno 100 koraka. Svaka konformacija je najprije optimizirana algoritmom konjugiranog gradijenta prema Polaku i Ribièreu (PRCG) dok nije postignuto 10 000 iteracija ili dok vrijednost gradijenta nije postala manja od 0,05 kJ mol⁻¹ Å⁻¹. Nakon toga optimizacije PRCG algoritmom, konformacije su optimizirane algoritmom krnjeg Newtonovog konjugiranog gradijenta (TNCG) koja se provodila sve dok nije postignut isti broj iteracija (10 000) ili ista vrijednost gradijenta (0,05 kJ mol⁻¹ Å⁻¹) kao za prethodni algoritam. Konformeri su definirani kao redundantni ako im RMSD vrijednost iznosi manje od 50 pm. Maksimalni broj struktura koji je bilo moguće pohraniti u tijeku jedne pretrage iznosio je 10 000, a energetski prozor iznosio je 20 kJ mol⁻¹, odnosno sačuvane su samo one konformacije koje su se nalazile unutar 20 kJ mol⁻¹ od energetski najpovoljnije konformacije nađene tijekom pretrage.

Izlazne strukture dobivene Monte Carlo konformacijskom pretragom potom su grupirane (klasterirane) na osnovu RMSD-a s pomoću programa Gromacs (v. 2016.4) (Abraham i sur. 2015) korištenjem Gromosovog algoritma za klasteriranje uz graničnu vrijednost (engl. *cutoff*) od 2,5 Å i od 3,5 Å. Kako bi ispitali konformacijsku slobodu svakog od liganada u svakom od 4 otapala grupiranje je provedeno na skupovima konformera koji su dobiveni u nekom od četiri otapala za svaki od istraživanih liganada. Klasteriranje je provedeno i kako bi odabrali konformacije koje smo koristili kao ulazne strukture u narednim koracima. Predstavnici pojedinih klastera dobiveni za svaki ligand u jednom od 4 otapala korišteni su u računima molekuskog uklapanja. U oba slučaja grupiranje je provedeno gromos metodom ali je u svrhu analize konformacijskog prostora korištena granična vrijednost od 2,5 Å, a u svrhu probira liganada za daljnje analize 3,5 Å.

2.2 Priprema ribosoma

Struktura ribosoma s eritromicinom vezanim u PTAR-u preuzeta je iz PDB baze podataka (PDB ID: 4V7U). Struktura je dobivena izolacijom ribosoma iz bakterije *Escherichia coli* (soj MRE600), a eritromicin je u strukturu uveden tehnikom namakanja (engl. *soaking*). Struktura ribosoma riješena je do rezolucije od 3,1 Å (Dunkle i sur. 2010) i pohranjena je u četiri PDB-datoteke, a za potrebe ovog istraživanja korištena je datoteka koja sadrži PTAR s vezanim eritromicinom te okolne nukleotide i aminokiseline.

U svrhu pripreme strukture ribosoma za simulacije u fiziološkim uvjetima, struktura povučena iz PDB baze podataka obrađena je programom Protein Preparation Wizard 9 (Schrödinger, LLC, New York, 2018) koji dodaje atome vodika, parametrizira atome, stvara disulfidne mostove između sumpornih atoma cisteinskih ostataka ukoliko su atomi udaljeni manje od 3,2 Å i određuje redove kemijskih veza. U sklopu programa Protein Preparation Wizard su programi Epik, PROPKA (Sondergaard i sur. 2011) i protassign koji su korišteni za određivanje protonacijskih stanja i tautomernih oblika aminokiselina i eritromicina. Optimizacija mreže vodikovih veza provedena je pri pH 7,5. Ova vrijednost je odabrana jer pH vrijednost citoplazme bakterije *Escherichia coli* u ljudskom probavnom sustavu varira od 7,2 do 7,8 (Wilks i sur. 2007). Naposljetku je provedena optimizacija geometrije sustava pri čemu je gibanje vodikovih atoma ograničeno konstantom sile koja iznosi $0,10467 \text{ MJ mol}^{-1} \text{ Å}^{-2}$.

Prije daljnje upotrebe uklonjene su sve molekule vode i ioni magnezija udaljeni više od 0,5 Å od veznog mjesta, kao i svi aminokiselinski i nukleotidni ostaci udaljeniji više od 5000 Å od molekule eritromicina. Naime, zbog ograničenja programa Autodock 4 (Morris i sur. 2009) bilo je potrebno provesti smanjenje sustava. Naposljetku je uklonjena i molekula eritromicina kako bi sustav bio pripremljen za račune molekulskog uklapanja.

2.3 Molekulsko uklapanje

S pomoću programa AutoGrid 4 (Morris i sur. 2009) izrađena je mreža (engl. *grid*) koja se sastoji od 200 376 točaka međusobno razmaknutih za 3,75 Å tako da se duž svake od osi trodimenzionalnog prostora nalazilo 126 točaka. Struktura ribosoma pripremljena programom Protein Preparation Wizard (Schrödinger, LLC, New York, 2018) je korištena kao receptor, a konformeri koji predstavljaju energetske minimume liganada u svakom od 4 modela otapala i konformeri koji najbolje predstavljaju klastere dobivene konformacijskim pretragama liganada korišteni su kao ligandi tijekom pretrage.

Tipovi atoma koji su korišteni kako bi se svakoj točki mreže dodijelila vrijednost potrebna za izračun energije uklapanja su aromatski ugljik koji ne veže vodik, alifatski ugljik koji ne veže vodik, dušik koji ne veže vodikove atome, dušik koji veže dušikove atome, kisik koji veže 1 vodik, kisik koji ne veže vodike, sumpor koji ne veže vodike, te fluor. Parametri korišteni tijekom ovog izračuna razvijeni su za AutoDock verziju 4.1 (Morris i sur. 2009). Prilikom izračuna vrijednosti koje se dodjeljuju točkama mreže korišten je model kontinuiranog medija kod kojeg se potencijal mijenja s udaljenošću s obzirom na AD4 model s parametrom 0,1465. Centar generirane mreže nalazi se na položaju $-73,516$ Å, $-58,485$ Å, $6,627$ Å u odnosu na koordinatni sustav ulazne PDB strukture.

Pretraživanje je provedeno s pomoću programa AutoDock 4 (Morris i sur. 2009), a algoritam korišten tijekom konformacijske pretrage je Lamarckian Genetic algoritam (Morris i sur. 1999). Maksimalni broj procjena konformacijske energije iznosi 2 500 000, a broj pokušaja za pronalazak povoljnog minimuma iznosi 100. Dobivene konformacije su dalje korištene za Monte Carlo konformacijsku pretragu ukoliko predstavljaju konformere najmanje energije za pojedini ligand ili ukoliko se radi o konformeru čiju geometriju vezanja smo htjeli dodatno istražiti.

2.4 Konformacijska pretraga ribosoma u PTAR-u bakterije *Escherichia coli*

Početne strukture za konformacijsku pretragu Monte Carlo metodom pripremljene su s pomoću programskog paketa Schrodinger (Schrödinger, LLC, New York, 2018). Osim konformera koji predstavljaju konformere najmanje energije za pojedini ligand, korišteni su i konformer prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Konformacije koje su korištene kao ulazne strukture za Monte Carlo simulaciju liganada u PTAR-u ribosoma. Prikazane su i opisane one strukture koje nisu konformacije najmanje energije dobivene metodom molekuskog uklapanja.

Ime liganda	Opis liganda
A*met	Konformer najmanje energije dobiven Monte Carlo konformacijskom pretragom liganda A u PTAR-u ribosoma kojem su na amino skupinu C6' atoma A2058 23S rRNA dodane dvije metilne skupine
A*mut	Konformer najmanje energije dobiven Monte Carlo konformacijskom pretragom liganda A u PTAR-u ribosoma sa A2058G mutacijom
C*	Konformer liganda C dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 0,69 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i>
C*met	Konformer liganda C dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 0,69 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i> kojem su na amino skupinu C6' atoma A2058 23S rRNA dodane dvije metilne skupine
C*mut	Konformer liganda C dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 0,69 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i> sa A2058G mutacijom
D*	Konformer liganda D dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 0,28 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i>
D*met	Konformer liganda D dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 0,28 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i> kojem su na amino skupinu C6' atoma A2058 23S rRNA dodane dvije metilne skupine
M*	Konformer liganda M dobiven molekuskim uklapanjem koji ima 4,6 kJ mol ⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma <i>Escherichia coli</i>

Znak * označava da se ne radi o konformeru koji s obzirom na rezultate molekuskog uklapanja konformacijske pretrage ima najmanju energiju. Znak met označava da je unutar PTAR-a u kojem je provedena Monte Carlo konformacijska pretraga liganda A2058 23S rRNA dimetiliran, dok znak mut označava da je Monte Carlo konformacijska pretraga liganada provedena u PTAR-u s A2058G supstitucijom.

Programom Macro Model (Schrödinger, LLC, New York, 2018) definirano je područje kompleksa na kojem je dozvoljena promjena geometrije strukture, a to područje obuhvaća ligande te sve nukleotide i aminokiseline koji se nalaze na udaljenosti od 2,5 Å u odnosu na ligand, dok su ostali atomi u strukturi fiksirani. Zadržani su svi nukleotidi i aminokiseline koji su udaljeni manje od 15 Å od svakog od konformera koji je korišten kao početna konformacija tijekom Monte Carlo konformacijske pretrage.

Pretraga je provedena uz korištenje implicitnog modela vode i polja sila OPLS_2005. Maksimalni broj koraka tijekom konformacijske pretrage iznosio je 10 000, a konformacije su optimizirane u dva koraka. Prvi korak uključuje optimizaciju PRCG algoritmom, a drugi korak uključuje optimizaciju TNCG algoritmom. U oba slučaja korišteno je po 500 optimizacijskih koraka u svrhu pronalaženja konformera koji odgovaraju lokalnom minimumu sustava. Također, tijekom svakog Monte Carlo koraka dolazi do translacije i rotacije liganda. Maksimalna translacijska udaljenost pritom iznosi 5 Å, a ligand se rotira za maksimalno 180° u sva tri smjera, u odnosu na početnu poziciju. Ostale vrijednosti koje su korištene prilikom pretraživanja kompleksa identične su onima koje su korištene tijekom konformacijske pretrage liganada. Također, programom Macro Model izračunata je i energija ribosomskog dijela kompleksa korištenog prilikom Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u ribosomu. Pritom je korišteno polje sila OPLS_2005, simulacija je provedena u implicitnom modelu vode, a udaljenost unutar koje se računa entalpijski doprinos potencijalnoj energiji sustava za van der Waalove i elektrostatske interakcije iznosi 8 Å, a za vodikove veze 4 Å.

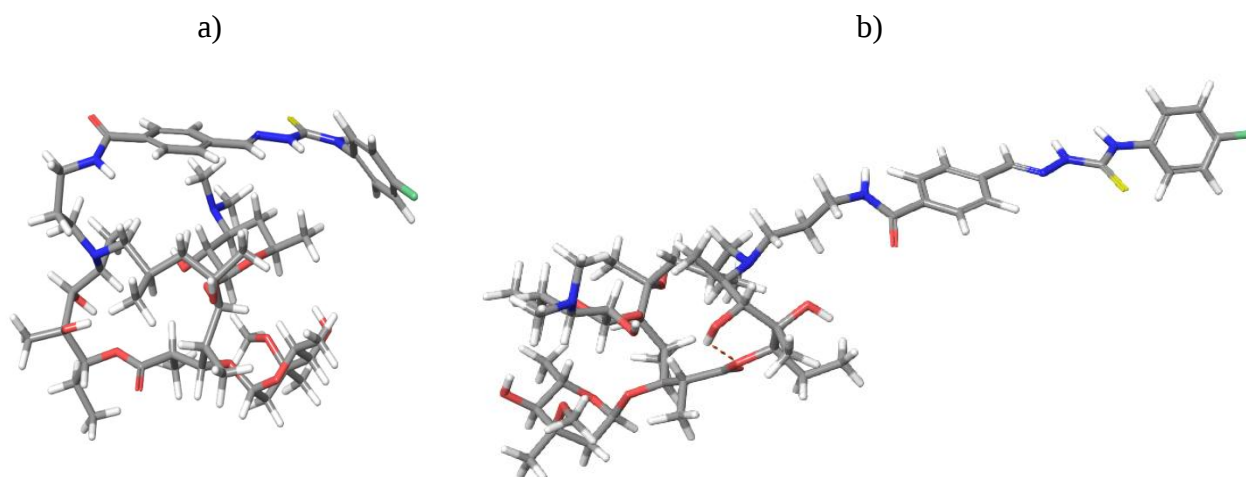
3 Rezultati

3.1 Monte Carlo konformacijska pretraga liganada u različitim modelima otapala

3.1.1 Zastupljenost konformacija i intramolekulske vodikove veze

Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage azitromicina u implicitnom modelu vode rezultirali su s najmanjim brojem konformera pronađenih Monte Carlo simulacijama liganda u nekom od modela otapala. Najveći broj konformera pronađen je Monte Carlo pretragom liganda E u implicitnom modelu oktanola. Monte Carlo konformacijskom pretragom azitromicina u implicitnom modelu vode pronađeno je 6, dok je konformacijskom pretragom liganda E u implicitnom modelu oktanola pronađen 351 konformer unutar 20 kJ mol⁻¹.

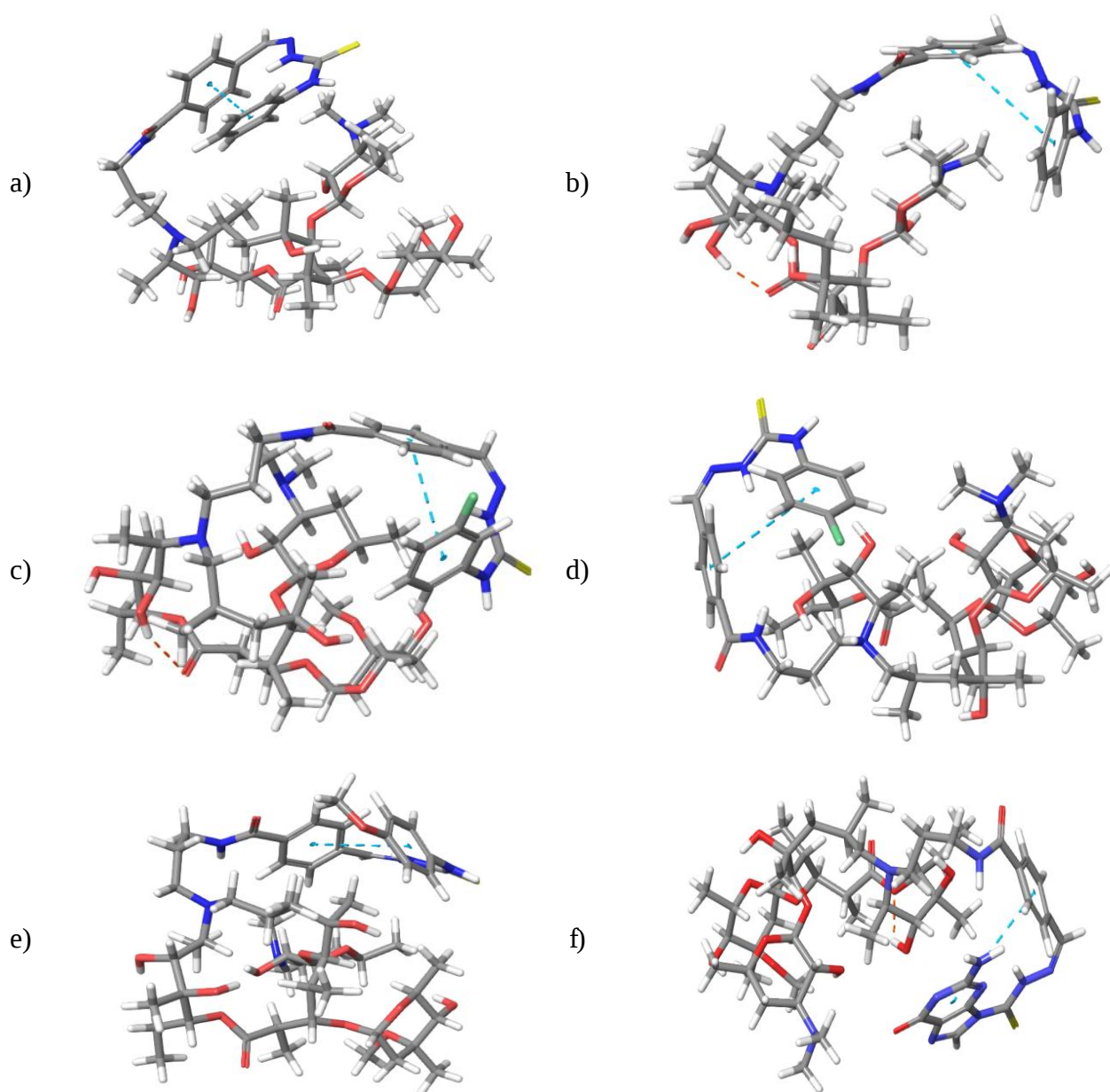
Konformacija kod koje je semitiokarbazoniski supstituent orijentiran na način da se terminalni aromatski prsten semitiokarbazoniskog supstituenta nalazi u blizini makrolaktonskog prstena obilježje je svih konformera pronađenih Monte Carlo konformacijskom pretragom u 4 različita modela otapala za svaki istraživani ligand (slika 4a). Kod konformera viših energija terminalni dio semitiokarbazoniskog supstituenta je ponekad znatno više udaljen od makrolaktonskog prstena nego što je karakteristično za energetski najpovoljniji konformer (slika 4b). Konformacijskom pretragom liganada koji na terminalnom aromatskom prstenu imaju puno polarnih skupina dobivene su strukture kod kojih je terminalni dio semitiokarbazoniskog prstena udaljen od makrolaktonskog prstena i kod konformera niže energije. Prilikom udaljavanja terminalnog dijela semitiokarbazoniskog supstituenta od laktonskog prstena dolazi do prekida van der Waalsovih interakcija koje aromatski prstenovi supstituenta stvaraju s hidrofobnim skupinama makrolaktonskog prstena. Ligandi s hidrofilnim terminalnim dijelom semitiokarbazoniskog supstituenta češće poprimaju konformacije s terminalnim semitiokarbazoniskim supstituentnom udaljenim od laktonskog prstena nego ligandi koji imaju pretežito hidrofoban terminalni dio semitiokarbazoniskog supstituenta.



Slika 4. Konformeri pronađeni Monte Carlo konformacijskom pretragom liganda D u mediju dielektrične konstante 81: a) energetski najpovoljniji konformer i b) konformer koji je 12,65 kJ mol⁻¹ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera.

3.1.2 Intramolekulske π –interakcije

Svi ligandi, osim liganda B, posjeduju 2 aromatska prstena koja kod liganada A i E tvore π –interakcije kod kojih su ravnine prstenova paralelne jedna s drugom, dok kod liganada C, D, G i M nalazimo intramolekulske π –interakcije pod kutom i udaljenošću između aromatskih prstenova. Kod liganada A, C i D ove nekovalentne interakcije se javljaju samo kod geometrija viših energija, dok ih kod liganada M i G nalazimo već odnosno unutar 20 kJ mol⁻¹ od energetski najpovoljnijeg konformera u toj pretrazi (slika 5).



Slika 5. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage – konformer liganda: a) A koji je $15,26 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, b) G u implicitnom modelu vode koji je $7,76 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, c) C koji je $16,84 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, d) D koji je $12,71 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, e) E koji je $4,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera, f) M koji je $5,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ energije nepovoljniji od najpovoljnijeg konformera. Konformeri na slikama a), b), c) i e) nađeni su pretragom u mediju dielektrične konstante 4, konformeri na slikama d) i f) u mediju dielektrične konstante 81.

U mediju dielektrične konstante 4, čak 11 od 18 konformera liganda E tvori intramolekulske π -interakcije. Iste interakcije unutar liganda E nalazimo i kod konformera dobivenih konformacijskom pretragom u mediju dielektrične konstante 81, kao i prilikom pretrage konformacijskog prostora liganda E u oktanolu i vodi.

Nekovalentne π -interakcije se pretežito javljaju kod konformera dobivenih Monte Carlo simulacijama u medijima dielektrične konstante 4 ili 81, a u slučaju liganda G nalazimo ih kod konformera dobivenih konformacijskom pretragom u implicitnom modelu vode. Najviše intramolekulskih π -interakcija je pronađeno prilikom konformacijske pretrage liganda M, tako da među konformerima dobivenim simulacijom u mediju dielektrične konstante 4, njih 7 od ukupno 100 tvori π -interakcije, dok u mediju dielektrične konstante 81, π -interakcije tvori čak 12 od ukupno 74 pronađena konformera.

3.2 Rezultati simulacija vezanja liganada u peptidil-transferazni centar i okolnu regiju ribosoma

3.2.1 Energija vezanja liganada u PTAR ribosoma bakterije

Escherichia coli

Simulacija vezanja liganda u okolinu peptidil-transferaznog centra (PTAR od engl. *peptidyl transferase-associated region*) ribosoma s pomoću metode molekulskog uklapanja rezultirala je energijama vezanja prikazanim u tablici 4. Iz priloženoga se vidi da najmanju energiju vezanja posjeduje kompleks PTAR-a i liganda C. Također, unutar 1 kJ mol⁻¹ od energetski najpovoljnijeg konformera nalazi se 9 geometrija liganda C u PTAR-u ribosoma. Energetski najpovoljniji način vezanja liganda A razlikuje se od najpovoljnijeg načina vezanja liganda C za svega 0,4 kJ mol⁻¹. Unutar energijskog okvira od 5 kJ mol⁻¹ pojavljuju se najpovoljniji načini vezanja liganada D,E,F,G,P i R, dok se unutar energetskog okvira od 10 kJ mol⁻¹ pojavljuju najpovoljniji načini vezanja liganada B i M. Najpovoljniji način vezanja azitromicina ima 11,2 kJ mol⁻¹ veću energiju od najpovoljnijeg načina vezanja liganda C. Konformeri kojima je izračunata najveća energija vezanja su dobiveni molekulskim uklapanjem eritromicina. Energetska razlika između najpovoljnije i najmanje povoljne geometrije vezanja iznosi 23,5 kJ mol⁻¹ što je energija reda veličine energije vodikove veze

(Zielkiewicz, J. 2005). Zbog male energetske razlike među konformerima raznih liganada navedeni podaci imaju samo orijentacijsku vrijednost koja može poslužiti za postavljanje prioriteta tijekom planiranja eksperimenata ili kao temelj za preciznije računalne simulacije.

Tablica 4. Rezultati molekulskog uklapanja liganada u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli*. Prikazani su konformeri s najmanjom energijom za svaki ligand. Svi dobiveni konformeri svakog od 10 liganada, kao i eritromicina i azitromicina, su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekulskog uklapanja.

redni broj strukture ^a	ligand	ΔG / kJ mol ⁻¹ ^b
1	C	-30,29
3	A	-29,87
24	F	-28,66
29	D	-28,58
41	G	-28,21
63	E	-27,81
181	P	-26,82
276	R	-26,42
701	B	-25,12
2336	M	-22,37
3856	azitromicin	-18,46
4338	eritromicin	-8,95

^aRedni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretku

^b ΔG označava iznos energije izračunate metodom molekulskog uklapanja.

Razlika u energiji konformera najmanje energije i konformera najveće energije dobivena Monte Carlo konformacijskom pretragom iznosi 97,7 kJ mol⁻¹ (tablica 5). Konformeri eritromicina imaju najveću energiju vezanja, a slijede ih konformeri azitromicina. Najmanju energiju, a time i optimalno vezanje, je postignuto kod liganda M. Ovo je suprotno očekivanju s obzirom na to da je metodom molekulskog uklapanja ligand M okarakteriziran lošim vezanjem. Monte Carlo konformacijska pretraga liganda M* rezultirala je konformerima od kojih onaj s optimalnim vezanjem ima energiju za 4,6 kJ mol⁻¹ veću od energije konformera najniže energija liganda M.

Tablica 5. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*. Prikazani su konformeri s najmanjom energijom vezanja za svaki ligand. Svi dobiveni konformeri svakog od 10 liganada, kao i eritromicina i azitromicina, su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom Monte Carlo.

redni broj konformera ^a	ime liganda	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ^{-1 b}
1	M	-142,4
3	C*	-137,9
4	M*	-137,8
18	F	-133,4
37	D	-130,7
74	A	-125,4
87	D*	-123,4
105	C	-121,7
127	G	-119,4
155	B	-115,5
207	R	-106,5
212	P	-103,9
237	E	-91,0
253	azitromicin	-80,0
266	eritromicin	-68,1

^aRedni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretku

^b $\Delta\Delta G$ označava iznos energije izračunate Monte Carlo metodom. Nazivi liganada su objašnjeni u tablici 3.

Iako se ligand C* odlikuje jednom od manjih energija vezanja, važno je primijetiti da je energija vezanja liganda C veća za 16,2 kJ/mol što ukazuje na veliku ovisnost rezultata o odabiru početne konformacije. Ligand F, kao i prilikom simulacija molekulskog uklapanja, ima relativno malu energiju vezanja. Nešto veću energiju ima najpovoljniji konformer liganda D, a najpovoljniji konformer njegovog strukturnog ekvivalenta, konformer D* ima 7,3 kJ/mol veću energiju.

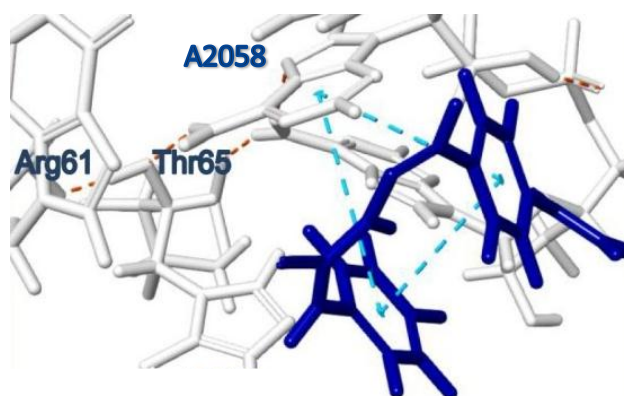
Najpovoljniji konformer liganda A ima $22,1 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera liganda C, što nije u skladu s rezultatima molekulskog uklapanja. Unutar energetskog okvira od 30 kJ u odnosu na energiju najpovoljnijeg konformera liganda M, nalaze se i najpovoljniji konformeri liganada G i R, unutar okvira od 40 kJ mol^{-1} su pronađeni najpovoljniji konformeri liganada P i B, dok se najpovoljniji konformer liganda E od najpovoljnijeg konformera liganda M razlikuje za $51,4 \text{ kJ mol}^{-1}$. To znači da je, s obzirom na rezultate Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u PTAR-u ribosoma, ligand E ligand s najlošijim vezanjem. Navedeni zaključak nije u skladu s rezultatima molekulskog uklapanja gdje ligand E posjeduje manju energiju vezanja od liganada B, M, P i R.

U slučaju svih liganada broj MC koraka tijekom pretrage pokazao se dovoljnim s obzirom da su energetski najpovoljniji konformeri nađeni više desetaka, a ponegdje i više stotina puta tijekom pretrage. Izuzetak su ligandi C*, R, i G te azitromicin kod kojih su najpovoljniji konformeri nađeni svega nekoliko puta te bi te pretrage bilo poželjno ponoviti s povećanim brojem MC koraka.

3.2.2 Intramolekulske π -interakcije liganada A, D i M u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*

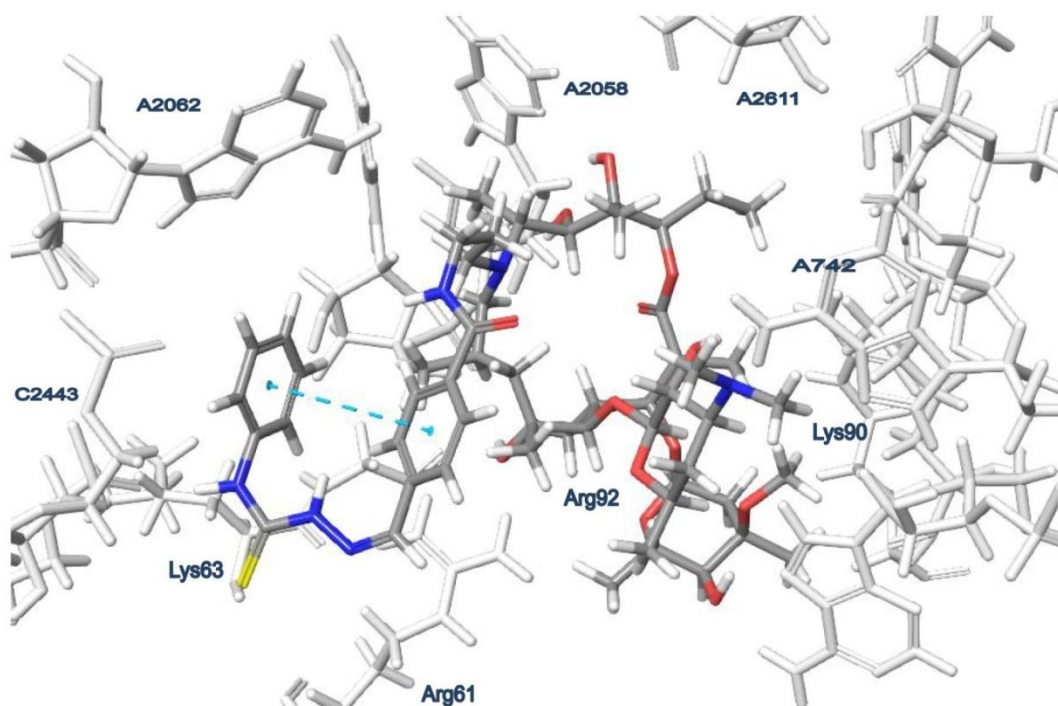
Molekulsko uklapanje liganda M te Monte Carlo konformacijska pretraga liganada A i D u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*, upućuju na to da navedeni ligandi prilikom vezanja u ribosom tvore intramolekulske π -interakcije. U slučaju liganda A ove nekovalentne interakcije nalazimo kod konformera najmanje energije, kod liganda D su prisutne kod konformera koji ima $0,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ veću energiju od konformera najmanje energije, a kod liganda M intramolekulske π -interakcije nalazimo kod konformera koji ima $4,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ veću energiju od konformera najniže energije.

Interakcije naslagivanja aromatskih skupina liganda i dušičnih baza u PTAR-u nisu pronađene niti kod jednog konformera koji posjeduje intramolekulske π -interakcije. Izuzetak je ligand D kod kojeg fluorobenzenski i centralni benzenski prsten semitiokarazonskog supstituenta tvore intramolekulske π -interakcije, ali oba aromatska prstena tvore i π -interakcije s purinskim prstenom A2058 (slika 6).



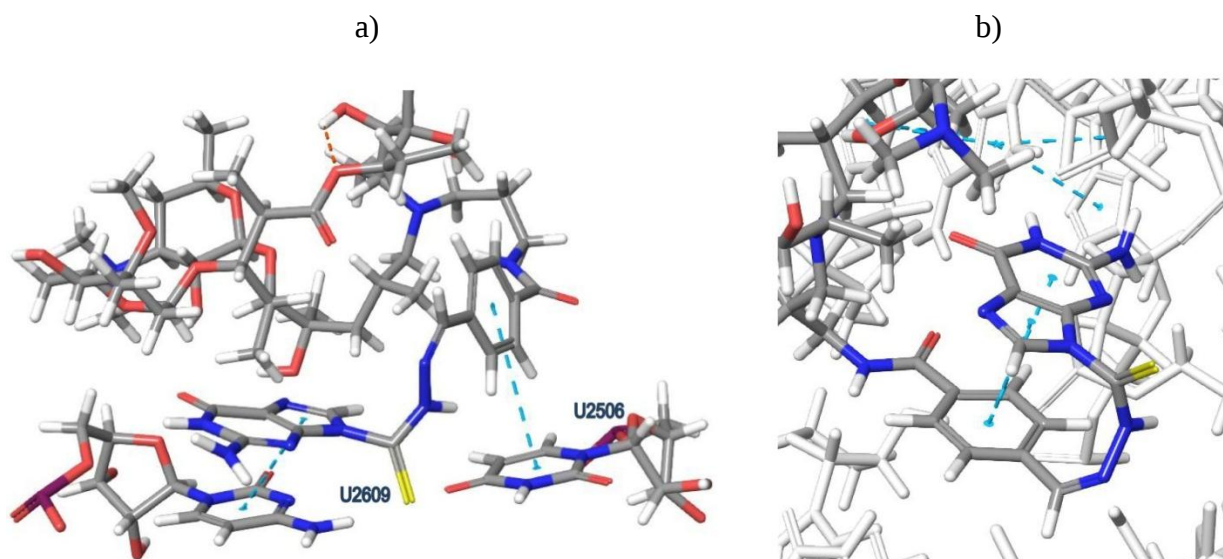
Slika 6. Energetski najpovoljniji način vezanja liganda D* u PTAR bakterije *Escherichia coli*. Ligand D* je prikazan tamnoplavom, a nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* bijelom bojom.

Unatoč tome što ne tvori naslagivanje s dušičnim bazama, ligand A stvara niz vodikovih veza koji stabiliziraju vezanje liganda. Dušik na koji je vezan terminalni benzenski prsten semitiokarbazonkog derivata tvori vodikovu vezu s fosfatom C2443 23S rRNA. Hidroksilne skupine laktonskog prstena tvore vodikove veze s karbonilnim kisikom peptidne okosnice Gly 64, amino-skupinama Arg 61 te N3' atomom purinskog prstena i ribozom nukleotida A2058 23S rRNA. Hidroksilna skupina kladinoze tvori vodikovu vezu s N7' dušikom te amino skupinom na C6' atomu A752 23S rRNA (slika 7).



Slika 7. Energetski najpovoljniji način vezanja liganda A u PTAR bakterije *Escherichia coli* dobiven Monte Carlo konformacijskom pretragom. Nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

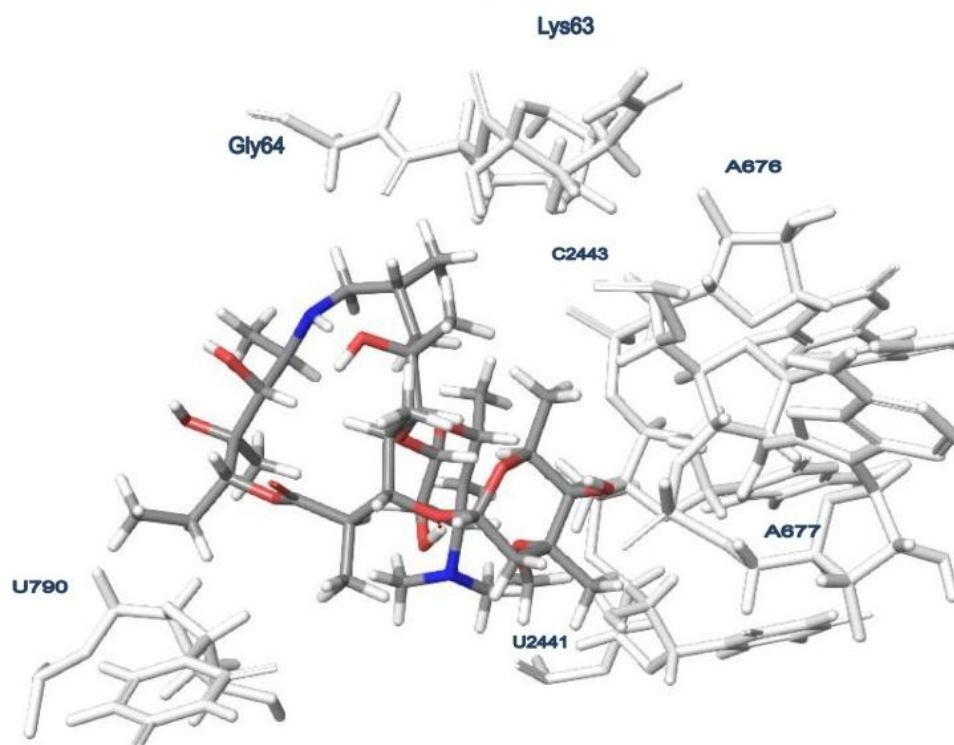
Rezultati simulacije molekulskog uklapanja liganda M u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* pokazali su kako laktonski prsten konformera najniže energije tvori hidrofobne interakcije s C2611, C2610 i U2506, benzenski prsten u sastavu semitiokarbazonškog supstituenta tvori π -interakcije s pirimidinskim prstenom U2506, a gvanin semitiokarbazonškog supstituenta tvori interakcije naslagivanja s C2609 (slika 8a). Konformer liganda M koji ima $0,56 \text{ kJ mol}^{-1}$ veću energiju od konformera najmanje energije stvara intramolekulske π -interakcije između benzenskog prstena i gvanina u sastavu semitiokarbazonškog supstituenta no tvori π -interakcije s nukleotidima u PTAR-u. Intramolekulske interakcije ovog tipa podjednako su zastupljene kod konformera niskih energija kao i geometrija karakterističnih za konformere više energije (slika 8b).



Slika 8. Rezultati molekulskog uklapanja liganda M u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) nekovalentne veze koje energetski najpovoljniji konformer tvori s nukleotidima U2506 i U2609 b) intramolekulske π -interakcije koje tvori konformer koji ima $0,56 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera. Na Slici b nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

3.2.3 Vezanje liganada B, C, D, C, P i R u najuži dio izlaznog kanala PTAR-a bakterije *Escherichia coli*

Simulacijama molekulskog uklapanja azitromicina u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* pronađena su dva načina vezanja azitromicina. Način koji je energetski povoljniji sličan je najpovoljnijem načinu vezanja eritromicina. Hidroksilna skupina kladinoze tvori vodikovu vezu s fosfatom U2586 23S rRNA, metilne skupine laktonskog prstena orijentirane su prema A2062, a do hidrofobnih interakcija dolazi i s aromatskim prstenovima C2611 i G2505 23S rRNA. Drugi konformeri se vežu na hidrofobnu površinu koju čine Gln 62, Lyn 63, Gly 64, A676, A677, C2443 i U790 te tako zatvaraju najuži prolaz izlaznog kanala koji se nastavlja na peptidil-transferazni centar (slika 9). Oba načina vezanja su pronađena i prilikom konformacijske pretrage metodom Monte Carlo.

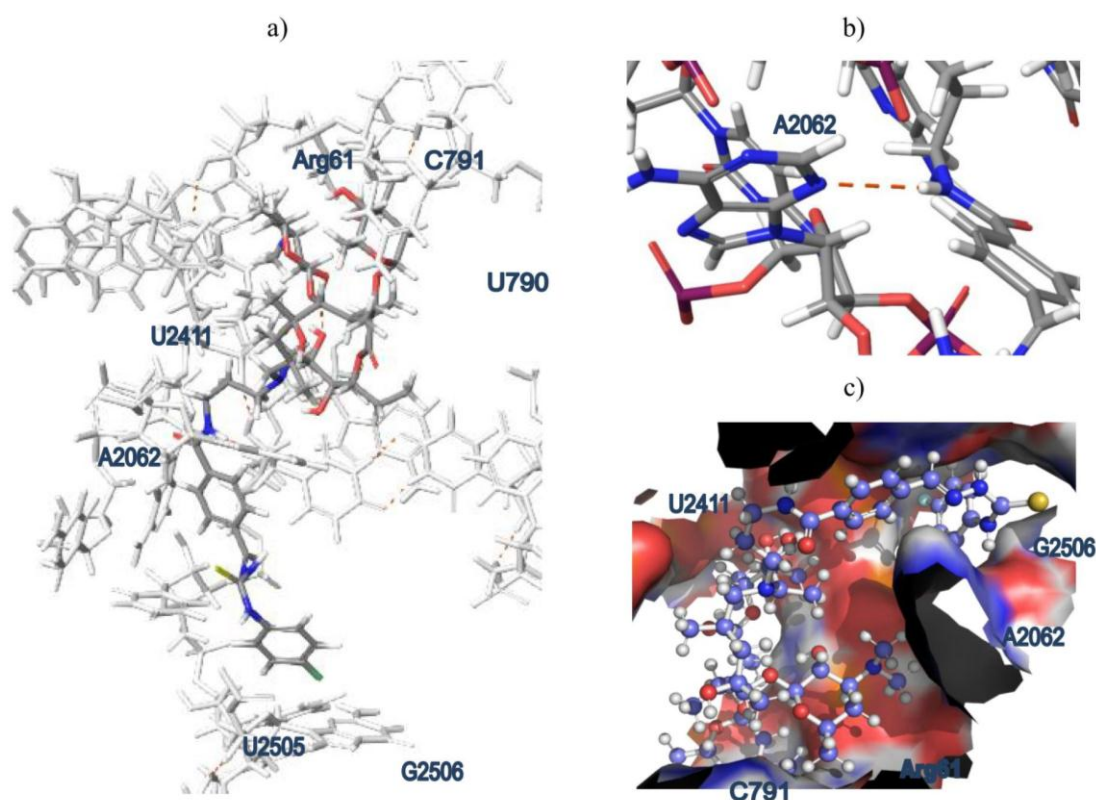


slika 9. Konformer azitromicina u najužem dijelu izlaznog kanala PTAR-a bakterije *Escherichia coli* dobiven metodom molekulskog uklapanja. Nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

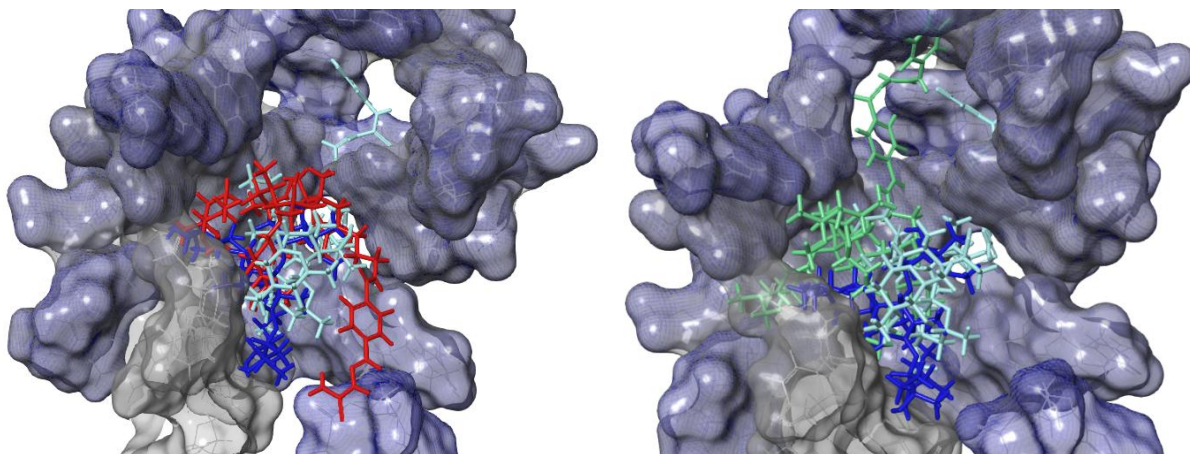
Monte Carlo simulacija liganda B u PTAR-u ribosoma rezultirala je konformacijama s velikim brojem vodikovih veza između fosfata 23S rRNA i donora vodikove veze koji nalazimo u sastavu liganda B. Metilne skupine na dušikovom atomu dezoamina se odmiču od purinskog prstena A792 što omogućuje približavanje hidroksidne skupine kladinoze fosfatu C791 pri čemu dolazi do stvaranja vodikove veze. Hidroksilna skupina na C12 atomu laktonskog prstena je donor vodikove veze koju akceptira fosfat C2442 23S rRNA, a dušikovi atomi semitiokarbazonskog supstituenta također tvore vodikove veze s fosfatima C2443 i A676. Vodikove veze semitiokarbazonskog supstituenta usmjeravaju navedeni supstituent u izlazni kanal PTAR-a.

Makrolaktonski prsten konformacije liganda D koja s obzirom na rezultate molekulskog uklapanja ima najmanju energiju vezanja, smješten je u istu šupljinu koju preferirano zauzima ligand B, no različito je orijentiran i tvori različite nekovalentne interakcije s okolnim nukleotidima i aminokiselinama (slika 11a). Hidroksilna skupina na 13C atomu laktonskog prstena također tvori vodikovu vezu s fosfatom U2441, a dušikov atom iz amidne veze supstituenta stvara vodikovu vezu s purinskim prstenom nukleotida A2062 (slike

10 a i 10b). Hidrofobna površina laktonskog prstena je vezana na U790, C791 i Arg 61 (slika 10c). Terminalni fluorobenzenski prsten je u PTAR-u smješten približno slično kao i fluorobenzenski prsten liganda C s razlikom što je kod liganda D prsten više usmjeren prema U2506 i G2505. Monte Carlo pretragom potvrđen je ovaj oblik vezanja.



Slika 10. Vezanja liganda D u PTAR bakterije *Escherichia coli*: a) energetski najpovoljniji način pronađen metodom molekuskog uklapanja, b) vodikova veza koju ligand tvori s A2062 kod energetski najpovoljnijeg načina vezanja pronađenog metodom molekuskog uklapanja, c) vezanje energetski najpovoljnijeg konformera dobivenog molekulskim uklapanjem liganda u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli*. Na slici a) nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.



Slika 11. Usporedba vezanja liganada B, C, D i azitromicina u vezno mjesto PTAR-a bakterije *Escherichia coli* izračunata metodom Monte Carlo (ligand B, azitromicin) i molekulskog uklapanja (ligand C i ligand D). Azitromicin je prikazan tamnoplavom, ligand B crvenom, ligand C zelenom i ligand D svijetloplavom bojom. Orijentacija veznog mjesta ista je na lijevoj i desnoj slici.

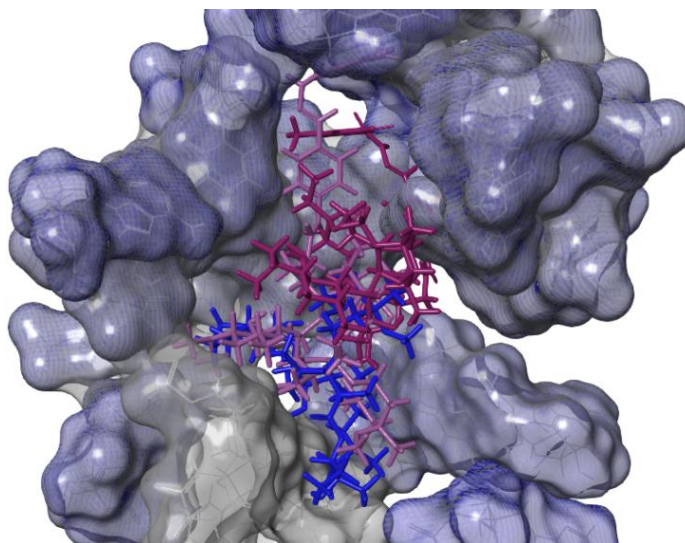
Molekulsko uklapanje liganda C u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* pokazalo je da su interakcije koje makrolaktonski prsten liganda tvori u veznom mjestu slične nekovalentnim reakcijama koje u veznom mjestu tvori ligand D (slika 11b). Hidroksilna skupina na 13C atomu laktonskog prstena tvori vodikovu vezu s fosfatom U2441. Hidrofobna površina laktonskog prstena kao i alkilne skupine monosaharida koje se nalaze na istom prstenu vežu se na površinu koju čine U790, U1779, A1780 i U1781. Nukleotid U2441 je akceptor vodikove veze koju stvaraju hidroksilna skupina laktonskog prstena i fosfat nukleotida, a Monte Carlo pretragom pronađena je i vodikova veza gdje hidroksilna skupina riboze U2441 djeluje kao donor, a hidroksilna skupina kladinoze akceptor vodikove veze.

Monte Carlo konformacijskom pretragom je također utvrđeno da dezoamin tvori vodikovu vezu s fosfatom U790. Kod rezultata molekulskog uklapanja terminalni aromatski prsten na supstituentu N10 atoma laktonskog prstena pruža se prema C2610 i C2611, no s njima ne tvori π -interakcije, a boljom pretragom konformacijskog prostora metodom Monte Carlo pronađene su π -interakcije između terminalnog benzenskog prstena liganda C i U2609 23S rRNA.

Makrolaktonski prsten liganda P se tijekom simulacije molekulskog uklapanja veže na purinski prsten A2062 i U1782 te na alkilni dio aminokiselinog ostatka Arg 61. Također, hidroksilna skupina na C6 atomu laktonskog prstena tvori vodikovu vezu s fosfatom nukleotida C2442. Timin u sastavu semitiokarbazonskog supstituenta laktonskog prstena se

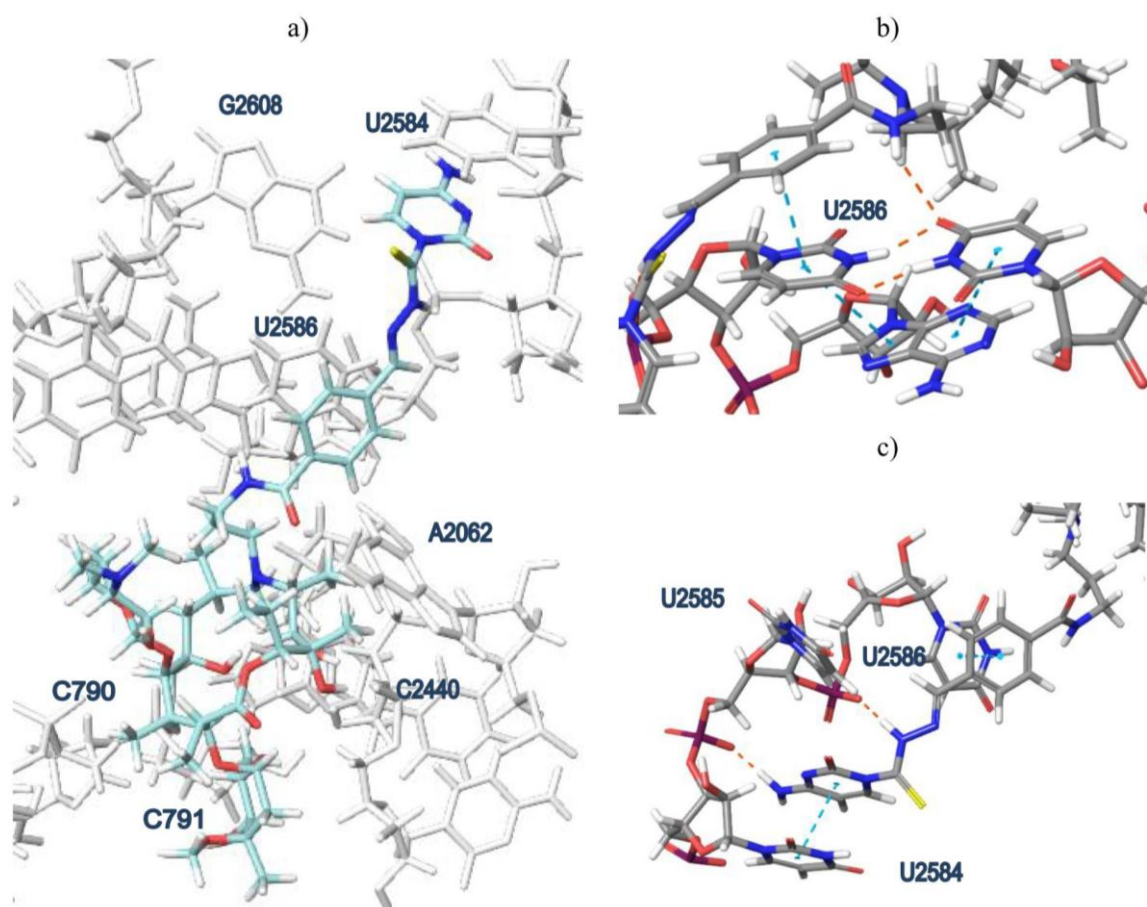
smjestio u šuplinu koju tvore U2585 i U2582, no ne tvori π -interakcije. Metodom Monte Carlo dodatno je istraženo vezanje liganda P u PTAR bakterije *Escherichia coli* te je pokazano da energetski najpovoljnija pronađena konformacija tvori vodikovu vezu između amino skupine na C6' atomu purinskog prstena A2062 i dušikovog atoma amidne veze u sastavu semitiokarbazonkog supstituenta. Nadalje, dušikov atom supstituenta laktonskog prstena tvori vodikovu vezu s fosfatom nukleotida U2586, dok timin u sastavu liganda P s navedenim nukleotidom tvori π -interakcije. Od hidrofobnih interakcija očuvane su interakcije s Arg 61 i Gly 64.

Laktonski prsten liganda R tijekom molekuskog uklapanja zauzima vezno mjesto koje veoma nalikuje onoj koju zauzima azitromicin (slika 12). Dezoamin vezan na laktonski prsten je orijentiran prema nukleotidima U790 i C791, kladinoza prema C2440, a ostatak prstena se veže između A2062 i U2441. Benzenski prsten semitiokarbazonkog supstituenta nalazi se između dušičnih baza A2062, U2586 i U2609 no ne tvori π -interakcije. Citozin u sastavu semitiokarbazonkog supstituenta tvori π -interakcije i to s pirimidinskim prstenom nukleotida A2610 23S rRNA.



Slika 12. Usporedba vezanja liganada P, R i azitromicina u vezno mjesto PTAR-a bakterije *Escherichia coli* izračunata metodom Monte Carlo. Aзитromicin je prikazan tamnoplavom, ligand P tamnoljubičastom, a ligand R svijetloljubičastom bojom.

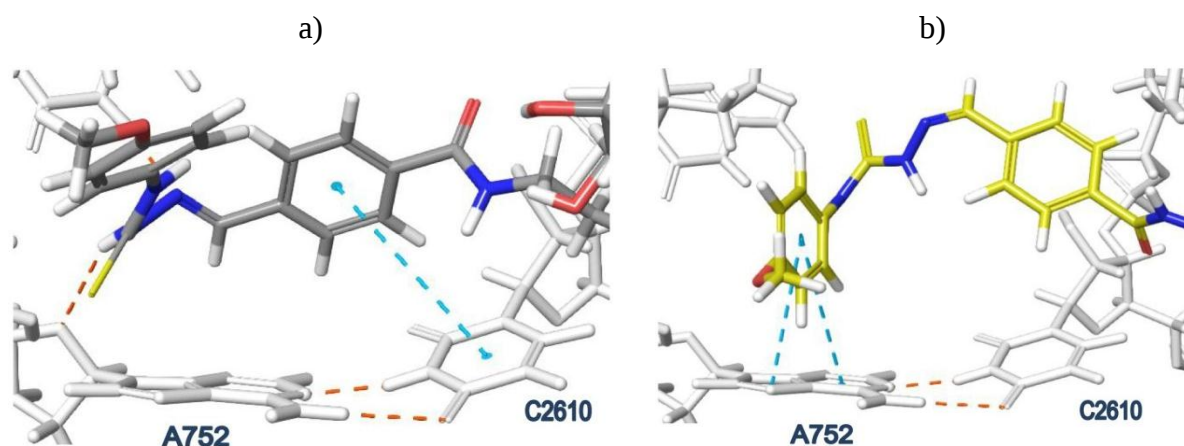
Monte Carlo simulacijama liganda R u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* utvrđeno je da se laktonski prsten liganda R veže na površinu koju tvore isti nukleotidi na koje se veže energetski najpovoljniji konformer dobiven metodom molekuskog uklapanja liganda R u PTAR (slika 13a). Osim toga, cisteinski ostatak liganda tvori π -interakcije s pirimidinskim prstenom U2584 (slika 13c). Cistein također tvori vodikovu vezu između amino-skupine i fosfata U2585. Benzenski prsten liganda R tvori π -interakcije s purinskim prstenom nukleotida A2586 (slika 13b).



Slika 13. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganda R u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*: a) geometrija vezanja energetski najpovoljnijeg konformera b) nekovalentne veze koje s U2586 23S rRNA tvori citozinski prsten liganda R c) nekovalentne veze koje ligand R stvara s nukleotidima U2584, U2585 i A2586. Na slici a nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

3.2.4 Uloga funkcionalnih skupina liganada E, F i G prilikom vezanja u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli*

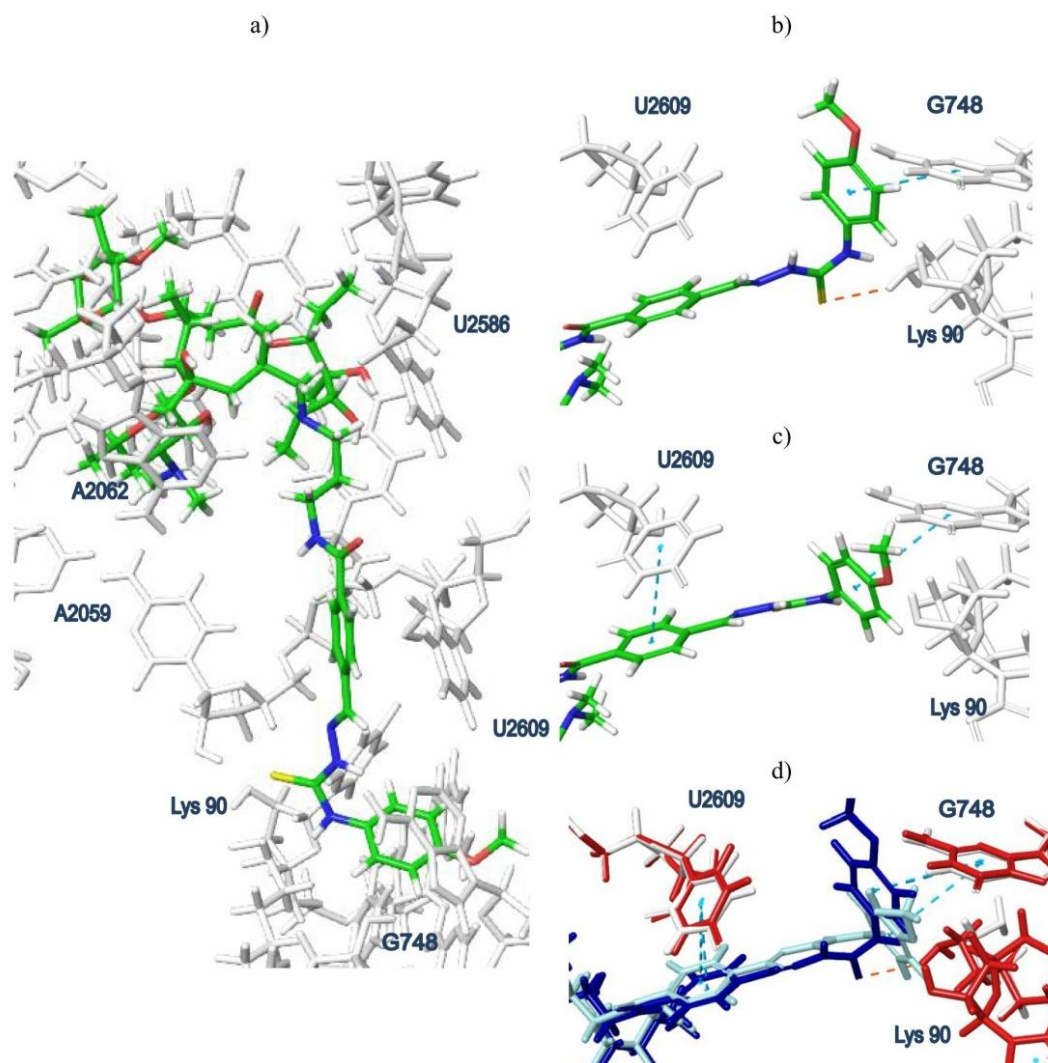
Energetski najpovoljniji oblik vezanja liganda E pronađen metodom molekuskog uklapanja je onaj u kojem dezoamin tvori hidrofobne interakcije s G2505, a ne stvara vodikovu vezu s A2058. Centralni benzenski prsten supstituenta tvori π -interakcije s C2610 dok je benzenski prsten s metoksidnom skupinom vezan na alkilni dio aminokiselinskog ostatka Lys 90. Ovu geometriju stabilizira vodikova veza između sumpora i kisika u sastavu riboze A752 (slika 14a). Osim ovog oblika vezanja pri neznatno višim energijama dolazi do tvorbe vodikove veze između A752 i metoksibenzenske skupine semitiokarbazonkog supstituenta (slika 14b).



Slika 14. Rezultati molekuskog uklapanja liganda E u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) nekovalentne interakcije između konformera najmanje energije te nukleotida C2610 i A752 23S rRNA, b) nekovalentne interakcije između konformera koji ima 1,80 kJ mol⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera i nukleotida A752. Nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

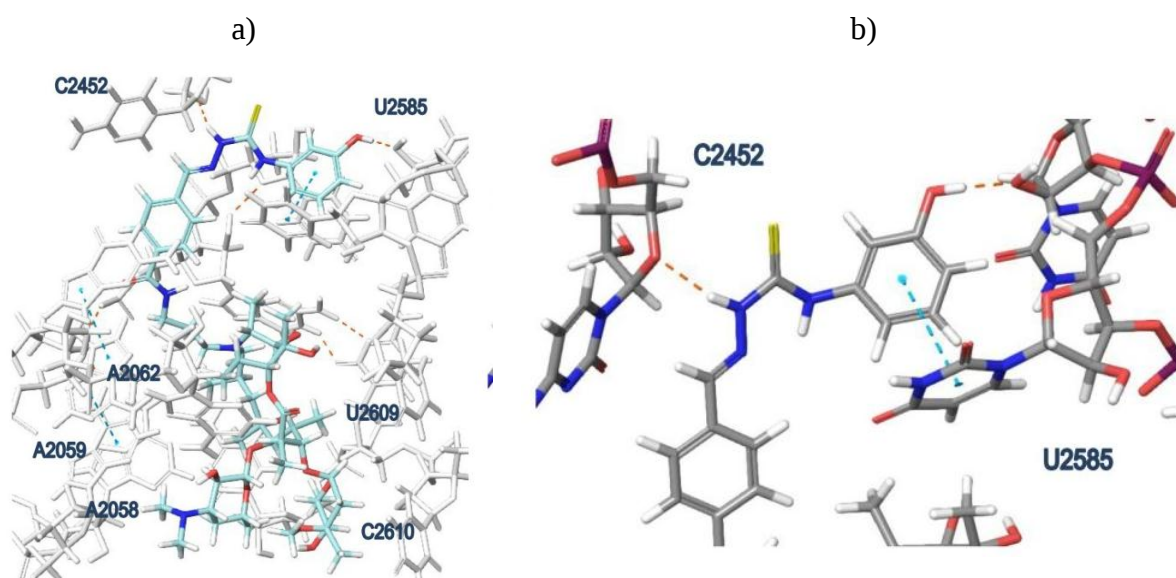
Rezultati Monte Carlo simulacija potvrdili su vezanje makrolaktonskog prstena liganda E koji je dobiven metodom molekuskog uklapanja (slika 15a). Metoksibenzenski prsten semitiokarbazonskog supstituenta liganda E tvori π -interakcije s G748 dok tio-skupina u sastavu semitiokarbazonskog supstituenta tvorbom vodikovih veza s amino-skupinom aminokiselinskog ostatka Lys90 usmjerava opisane π -interakcije (slika 15b i 15d). Kod konformera čija tio-skupina ne tvori vodikovu vezu dolazi do nastanka π -interakcija između

aromatskog prstena i U2609. Unatoč tome, ova pojava ne uzrokuje smanjenje potencijalne energije vezanja (slika 15c i 15d).



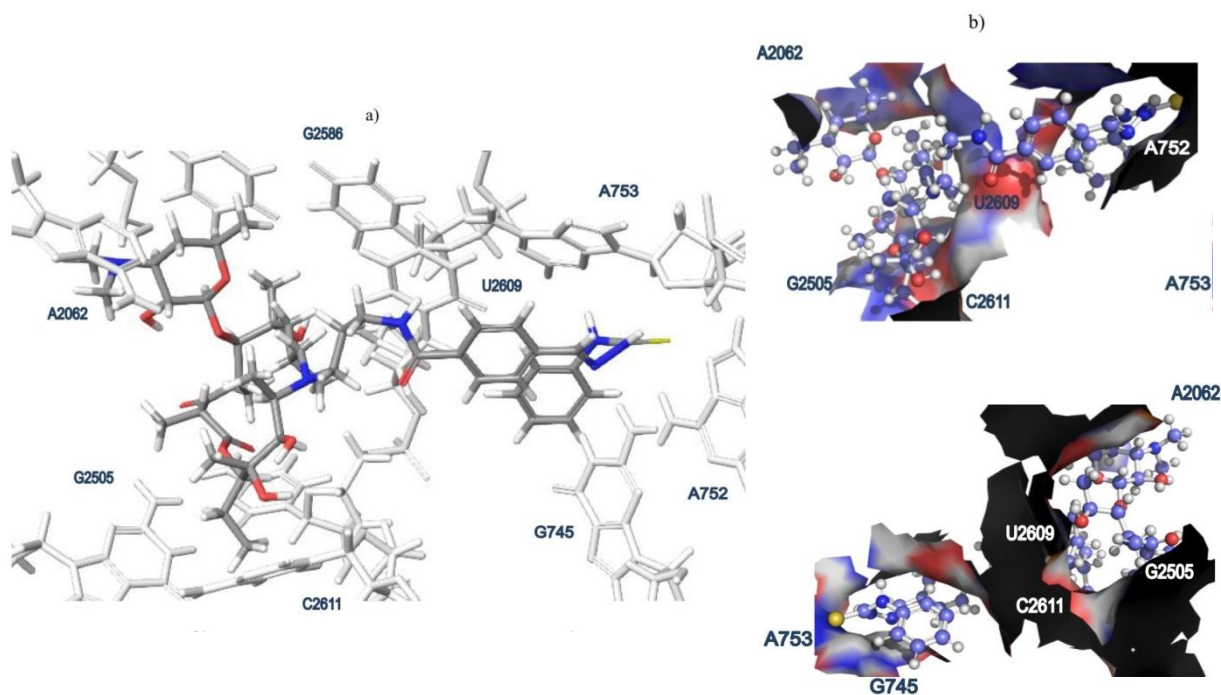
Slika 15. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganda E u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*: a) geometrija energetski najpovoljnijeg konformera, b) nekovalentne interakcije energetski najpovoljnijeg konformera s nukleotidom G748 i aminokiselinom Lys 90, c) nekovalentne interakcije između konformera koji ima 4,30 kJ mol⁻¹ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera i nukleotida G748 i U2609, d) usporedba nekovalentnih veza koje ligand tvori s nukleotidima G748 i U2609 te aminokiselinom Lys 90. Tamno plava i crvena boja označava konformaciju prikazanu na slici 15b, a svjetlo plava i bijela onu prikazanu na slici 15c.

Monte Carlo konformacijskom pretragom PTAR-a ribosoma bakterije *Escherichia coli* i liganda F (slika 16a) utvrđeno je da dezoamin laktonskog prstena ne tvori vodikovu vezu s A2058 23S rRNA. Također, fleksibilni semitiokabrazonski supstituent poprima druge oblike vezanja u istom veznom džepu kao i konformer s najboljim vezanjem izračunat metodom molekulskog uklapanja. Hidroksibenzenski prsten supstituenta na N10 atomu laktonskog prstena tvori reakcije naslagivanja s pirimidinskim prstenom U2585. Uz to, hidroksilna skupina hidroksibenzenskog prstena tvori vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom riboze U2584. Dušik hidrazonske veze je donor vodikove veze dok je akceptor kisik riboze C2452 (slika 16b).



Slika 16. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganda F u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*: a) geometrija energetski najpovoljnijeg konformera, b) nekovalentne interakcije energetski najpovoljnijeg konformera s nukleotidima U2585 i C2452. Na slici a) nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

Konformer s najmanjom energijom vezanja dobiven molekulskim uklapanjem liganda G u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* veže makrolaktonski prsten u isti vezni džep u koji se vežu laktonski prstenovi eritromicina i azitromicina. Usprkos tome nekovalentne interakcije koje ligand tvori s nukleotidima su bitno različite od onih koje u PTAR-u tvore azitromicin i eritromicin. Dezoamin je smješten između A2062 i G2586, a hidrofobna površina prstena tvori kontakte s G2505, C2610 i C2611. Oba aromatska prstena vežu se na površinu koju stvaraju A752, A753, G745 i U2609 (slike 17a, 17b i 17c).

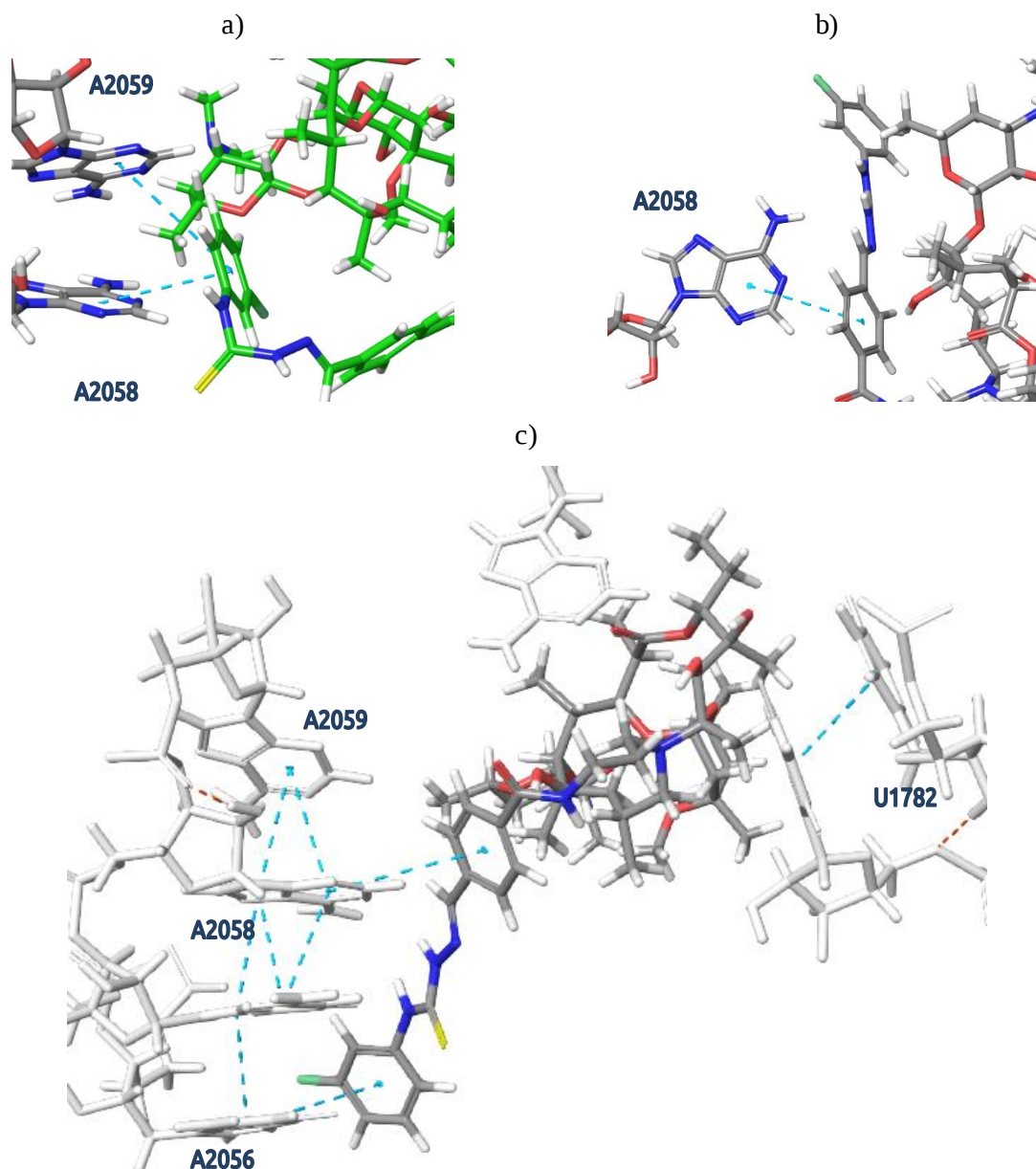


Slika 17. Rezultati molekuskog uklapanja liganda G u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) geometrija vezanja liganda G u PTAR b) položaj energetske najpovoljnijeg konformera na veznoj površini PTAR-a c) položaj energetske najpovoljnijeg konformera na veznoj površini PTAR-a i vezanje u kanal koji tvore nukleotidi A752, A753, G745 i U2609. Na slici a) nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

Opsežnije istraživanje vezanja liganda G provedeno je Monte Carlo konformacijskom analizom. Konformeri dobiveni na ovaj način imaju znatno različitu geometriju od ulazne strukture. Laktonski prsten se veže na površinu koju tvore A2062 i U2441, centralni aromatski prsten semitiokarbazonkog supstituenta se nalazi u blizini U2586, dok se položaj terminalnog benzenskog prstena mijenja ovisno o vodikovim vezama koje tvore dušikovi atomi vezani na tio-skupinu semitiokarbazonkog supstituenta. Ukoliko navedeni atomi stvaraju samo jednu vodikovu vezu s fosfatom nukleotida U2586 tada se terminalni benzenski prsten nalazi u blizini pirimidinskog prstena U1782 i U2609. Iako ne dolazi do stvaranja π -interakcija ovaj oblik vezanja je energetski povoljniji od oblika vezanja gdje dušikovi atomi semitiokarbazonkog supstituenta tvore dvije vodikove veze s fosfatom U2586. U tom slučaju dolazi do udaljavanja terminalnog benzenskog prstena od površine koju u PTAR-u tvore nukleotidi U1782 i U2609 te se smanjuje broj van der Waalsovih kontakata s navedenom skupinom.

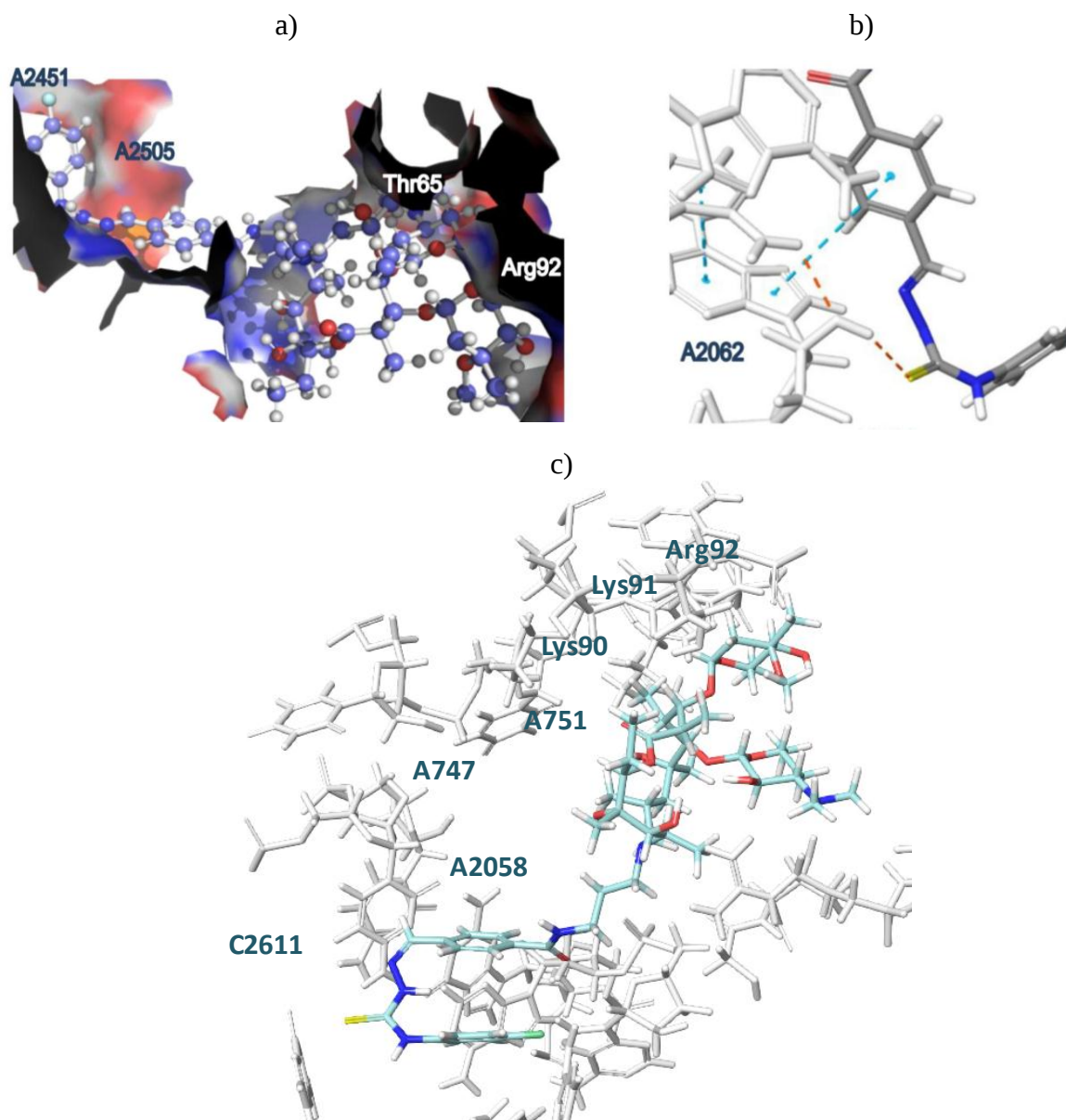
3.2.5 Monte Carlo konformacijska pretraga liganada C*, D* i M* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*

Konformeri više energije dobiveni molekulskim uklapanjem liganda C pokazuju sklonost stvaranju π -interakcija. Konformer koji ima $0,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ veću energiju od najpovoljnijeg konformera izračunatog metodom molekulskog uklapanja (ligand C*) tvori π -interakcije između terminalnog fluorobenzenskog prstena i dušičnih baza A2058 i A2059, dok se makrolaktonski prsten veže poput konformera najniže energije (slika 18a). Konformacijski prostor ovog liganda je dodatno istražen Monte Carlo simulacijama. Rezultati pretrage su pokazali kako terminalni fluorobenzenski prsten liganda C tvori π -interakcije s G2056 23S rRNA (slika 18c), dok centralni aromatski prsten semitiokarbazonkog supstituenta stvara π -interakcije s A2058 (slika 18b). Također dolazi do stvaranja vodikovih veza između dušikovog atoma kojim je fluorobenzenski prsten vezan na ostatak supstituenta i fosfata nukleotida C2505.



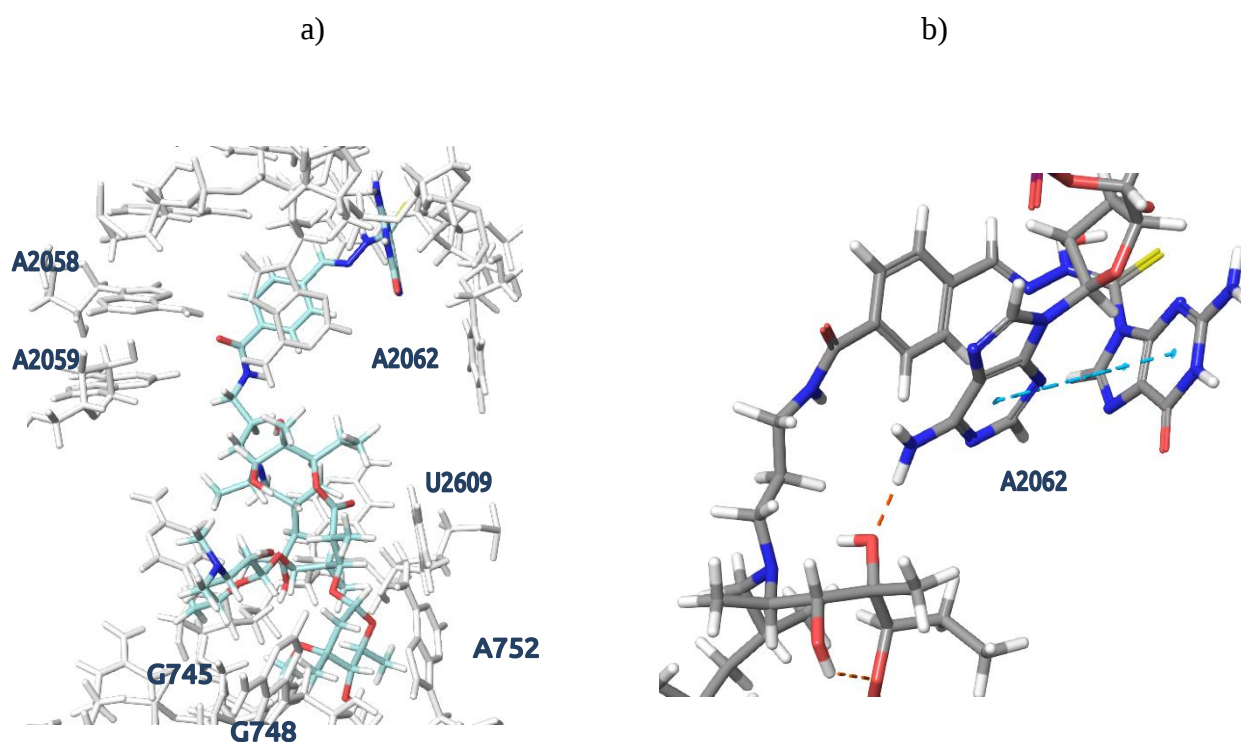
Slika 18. Konformeri liganda C: a) π -interakcije pronađene molekulskim uklapanjem kod konformera koji ima $0,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera u PTAR ribosoma *Escherichia coli*, b) π -interakcija između centralnog benzenskog prstena semitiokarbazonskog supstituenta liganda i purinskog prstena A2058 23S rRNA koja je pronađena Monte Carlo simulacijom liganda u PTAR-u ribosoma *Escherichia coli* kod konformera, c) geometrija vezanja liganda dobivena Monte Carlo konformacijskom pretragom konformera koja ima $0,69 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera izračunatog molekulskim uklapanjem. Na slici c) nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage konformera liganda D koji ima 0,28 kJ mol⁻¹ veću energiju od najpovoljnijeg konformera (ligand D*) dobivenog molekulskim uklapanjem pokazali su kako se kladinoza slično kao kod ulazne konformacije, hidrofobnim kontaktima veže na A751, Lys 90, Lys 91 i Arg 92 i tvori vodikovu vezu s Arg 61, dok se dezoamin hidrofobnim kontaktima veže na Thr 65 i Gly 64 a s hidroksilnom skupinom Thr 65 tvori vodikovu vezu (slika 19a i 19b). Fluorobenzenski i centralni benzenski prsten semitiokarazonskog supstituenta tvore intramolekulske π -interakcije uz koje i jedan i drugi prsten stvaraju π -interakcije s purinskim prstenom A2058 (slika 19c). Pri višim energijama centralni benzenski prsten tvori π -interakcije s A2058 dok flouorobenzenski prsten tvori interakcije naslagivanja s A2053.



Slika 19. Konformer liganda D, a) u PTAR-u bakterije *Escherichia coli* koji ima $0,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera pronađenog molekulskim uklapanjem. b) π -interakcija između centralnog benzenskog prstena semitiokarbazonkog supstituenta liganda i purinskog prstena A2058 koja je prisutna kod konformera koji ima $0,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera pronađenog molekulskim uklapanjem, c) energetski najpovoljniji način vezanja liganda u PTAR bakterije *Escherichia coli* pronađen Monte Carlo konformacijskom pretragom konformera koji ima $0,28 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera pronađenog molekulskim uklapanjem. Na slikama b) i c) nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

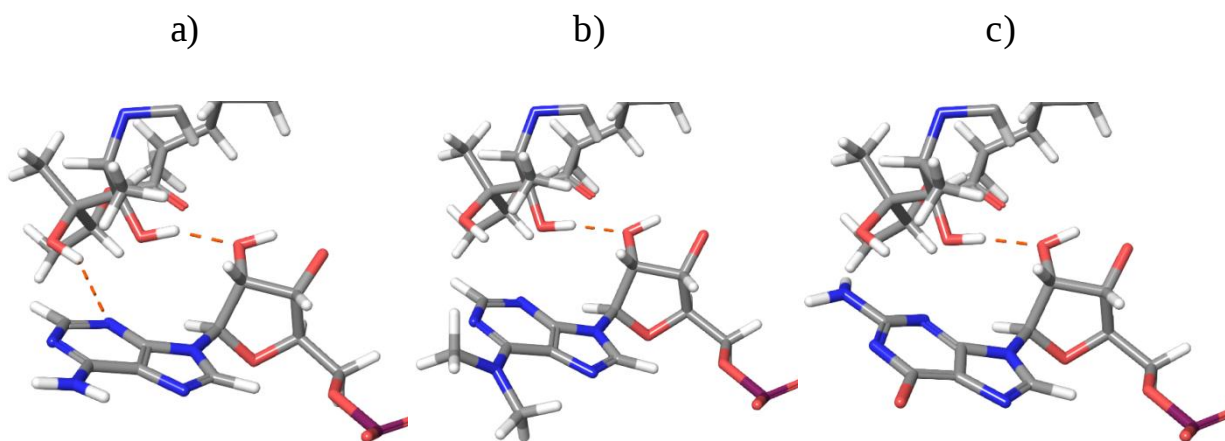
Konformacija liganda M koja ima $4,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ nepovoljniju energiju od najpovoljnijeg konformera dobivenog molekulskim uklapanjem (ligand M*) ima benzenski prsten semitiokarbazonskog supstituenta smješten u blizini A2058 i A2059. Konformacijska sloboda ovog konformera dodatno ispitana Monte Carlo simulacijama. Rezultati Monte Carlo pretrage su pokazali kako se laktonski prsten preferirano veže na G745, G748, A752, Lys90, Arg 92 i U2609. Gvaninski prsten tvori π -interakcije s A2062, karbonilni kisik amidne veze semitiokarbazonskog supstituenta tvori vodikovu vezu s amino-skupinom na C6' poziciji A2058 (slika 20).



Slika 20. Najpovoljniji oblik vezanja izračunat Monte Carlo simulacijom konformera liganda M kojem je energija $4,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ veća od najpovoljnijeg konformera izračunatog metodom molekulskog uklapanja a) vezanje u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* b) nekovalentne veze s nukleotidom A2062. Na slici a nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.

3.2.6 Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u PTAR-u s dimetiliranim A2058 23S rRNA ili u PTAR-u s A2058G mutacijom

Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganda A* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* u kojem je dimetiliran A2058 rezultirala je konformerom koji za razliku od ulazne konformacije (slika 21a) ne tvori vodikovu vezu između N3' atoma purinskog prstena A2058 i hidroksilne skupine na C12 atomu laktorskog prstena liganda A* (slika 21b). Navedena vodikova veza pritom se produžava s 3,6 Å na 4,3 Å, a kut se povećava sa 147° na 154,9°. Simulacije u PTAR-u ribosoma u kojem je uvedena A2058G supstitucija dovode do produljenja vodikove veze između purinskog i laktorskog prstena na 4,2 Å dok kut iznosi 151,9° (slika 21c). U sva tri slučaja očuvana je vodikova veza između hidroksilne skupine na C13 atomu laktorskog prstena i hidroksilne skupine riboze. Treba primijetiti da se energija najpovoljnijih konformacija liganda A* u ribosomu kakvog nalazimo kod bakterije *Escherichia coli* i energija najpovoljnijeg konformera liganda A* u ribosomu s dimetilirani nukleotidom A2058 razlikuje za 8,57 kJ mol⁻¹ (tablica 6). Ova razlika vjerojatno je uvjetovana uvođenjem hidrofobnih kontakata putem metilnih skupina purinskog prstena dimetiliranog A2058. Između konformera najniže energije dobivenog prilikom simulacije liganda A* u ribosomu u kojem se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi adenin i konformera kojem se na navedeno poziciji nalazi gvanin izračunata je razlika od 6,7 kJ mol⁻¹.



Slika 21. Monte Carlo simulacija liganda A* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi adenin a kao početna struktura je korišten konformer najniže energije dobiven metodom molekuskog uklapanja b) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi dimetilirani adenin, a kao početna struktura je korišten konformer najniže energije dobiven Monte Carlo pretragom liganda A* u PTAR-u c) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi gvanin a kao početna struktura je korišten konformer najniže energije dobiven Monte Carlo pretragom liganda A* u PTAR-u.

Tablica 6. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada A* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin, dimetilirani adenin ili gvanin. Svi dobiveni konformeri liganada A, A*, A*met i A*mut su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekuskog uklapanja. Redni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretку. Prikazano je prvih 15 konformera s najnižom energijom. Energetsku razliku između ribosoma s vezanim ligandom u odgovarajućoj konformaciji i ribosoma u kojem nije vezan ligand, pri čemu su oba energetska iznosa izračunata Monte Carlo metodom, označena je s $\Delta\Delta G$.

redni broj konformera ^a	ime liganda ^b	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ^{-1 c}
1	A*met	-133,97
2	A*met	-133,12
3	A*mut	-132,1
4	A*met	-131,38
5	A*mut	-130,6
6	A*met	-130,34
7	A*met	-130
8	A*met	-128,3
9	A*met	-127,9
10	A*mut	-127
11	A*mut	-126,2
12	A	-125,4
13	A*mut	-122,7
14	A	-122,5
15	A*mut	-121,9

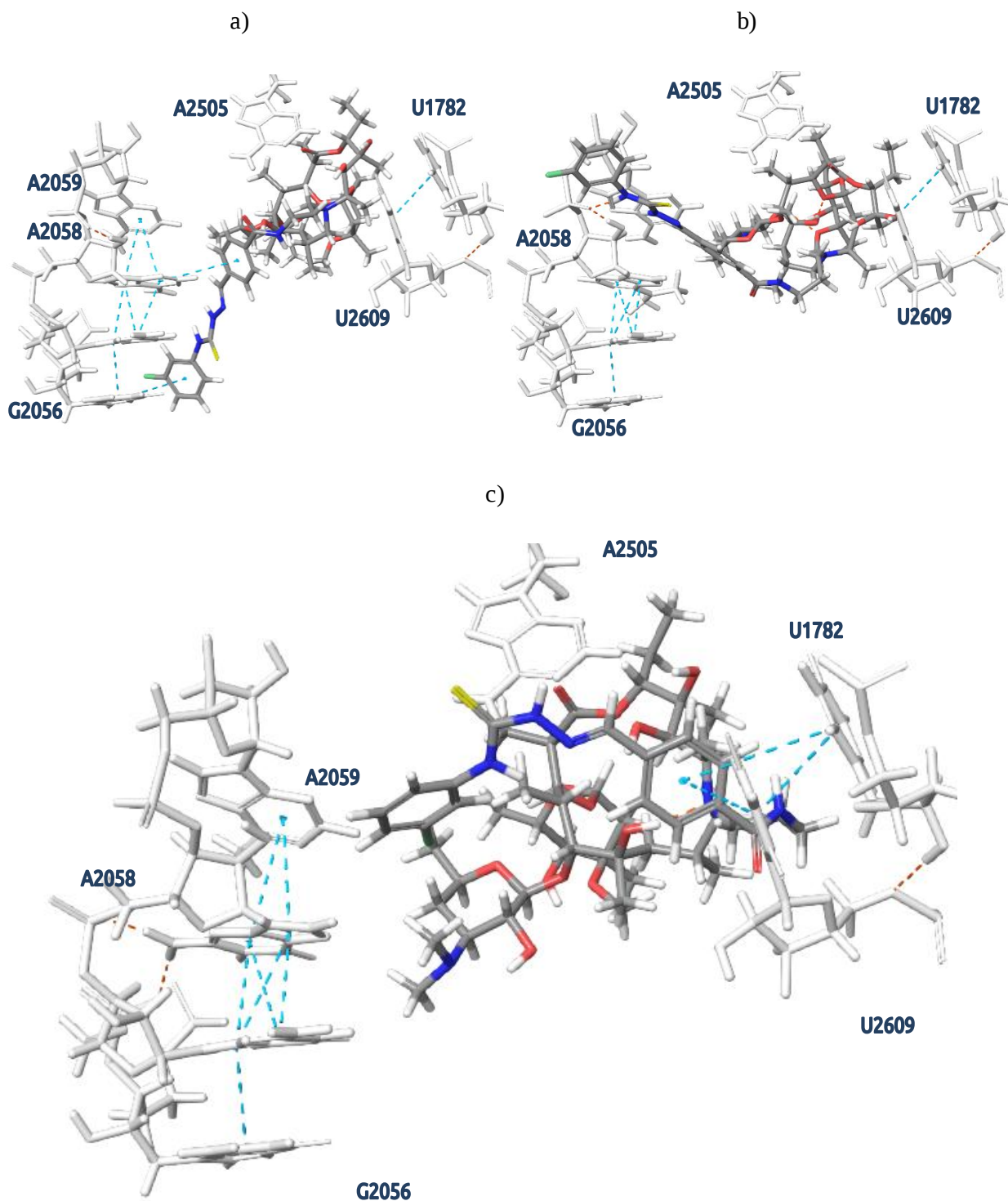
^a Svi dobiveni konformeri liganada A, A*met i A*mut su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekuskog uklapanja. Redni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretку. Prikazano je prvih 15 konformera s najnižom energijom.

^b Znak * označava da se ne radi o konformeru koji s obzirom na rezultate molekuskog uklapanja konformacijske pretrage ima najmanju energiju. Znak met označava da je unutar PTAR-a u kojem je provedena Monte Carlo konformacijska pretraga liganada A2058 23S rRNA dimetiliran, dok znak mut označava da je Monte Carlo konformacijska pretraga liganada provedena u PTAR-u s A2058G supstitucijom. Nazivi liganada su objašnjeni u tablici 3.

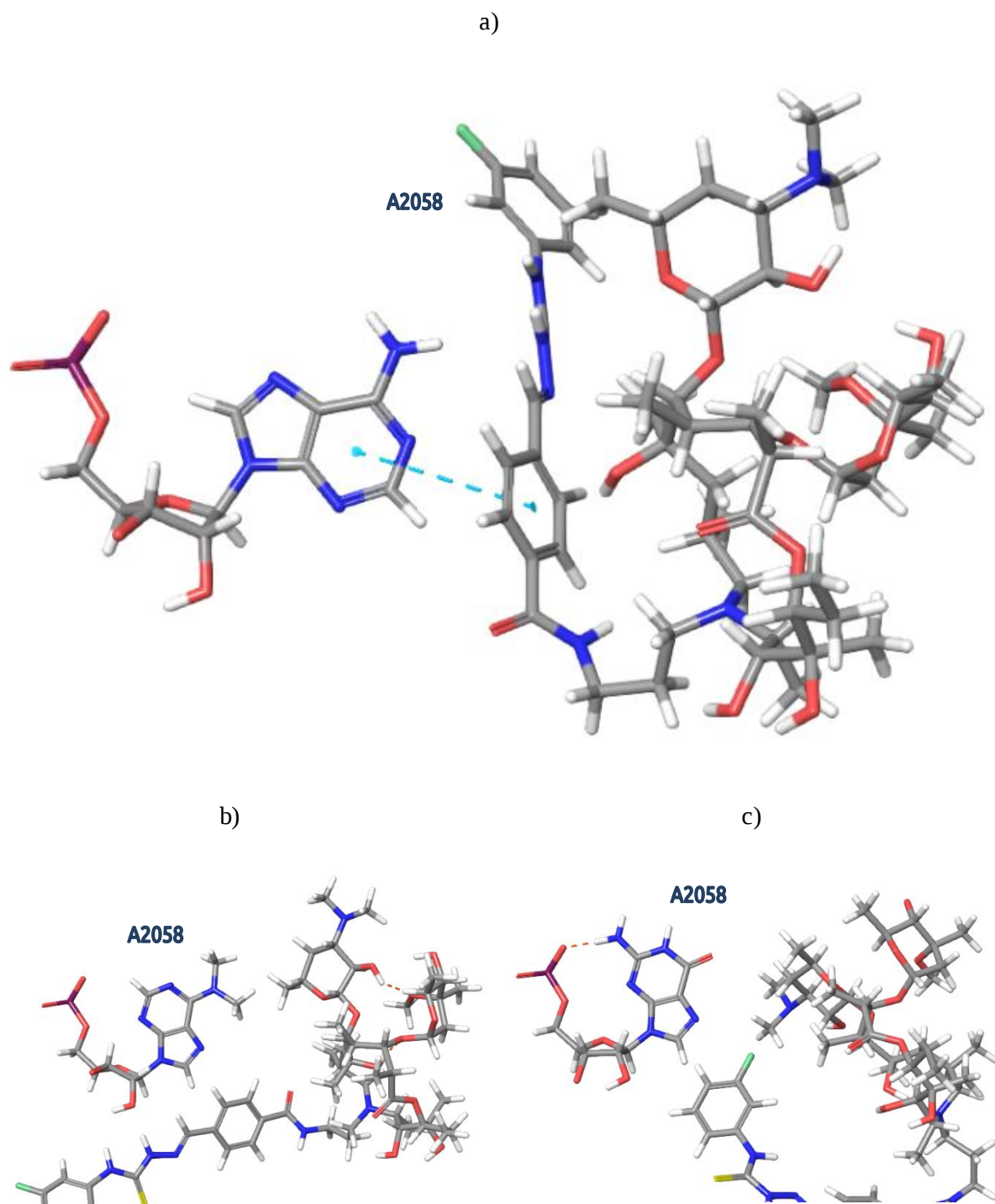
^c Energetsku razliku između ribosoma s vezanim ligandom u odgovarajućoj konformaciji i ribosoma u kojem nije vezan ligand, pri čemu su oba energetska iznosa izračunata Monte Carlo metodom, označena je s $\Delta\Delta G$.

Činjenica da se ligand A* najlošije veže u ribosom kakav je dobiven pripremom kristalne strukture ribosoma iznenađuje i s obzirom na činjenicu da takav ribosom ima jednu vodikovu vezu više u odnosu na ostale strukture. Međutim, iako je geometrija ostalih dijelova kompleksa veoma slična, male razlike u položaju atoma mogu rezultirati velikom ukupnom razlikom u energiji ukoliko su navedeni atomi veoma blizu i ukoliko sustav sadrži mnogo atoma. Također treba uzeti u obzir da je konformer najmanje energije dobiven Monte Carlo konformacijskom pretragom liganda A* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* korišten kao početna konformacija za Monte Carlo pretragu liganda A* u ostalim varijantama ribosoma. U svrhu usporedbe energije i oblika vezanja bilo bi bolje da je provedena još i Monte Carlo simulacija liganda A* u ribosomu gdje se na 2058. mjestu nalazi nemetilirani adenin a gdje je kao početna konformacija korišten isti konformer kao u slučaju simulacije u ribosomima s metiliranim A2058 ili s A2058G supstitucijom.

Monte Carlo konformacijska pretraga konformera liganda C* rezultirala je geometrijom vezanja gdje centralni aromatski prsten semitiokarbazonskog supstituenta tvori π -interakcije s purinskom prstenom A2058, dok terminalni fluorobenzenski prsten tvori π -interakcije s G2056 (slika 22a i 23a). Osim toga, dušikovi atomi vezani na tio-skupinu semitiokarbazonskog supstituenta donori su vodikove veze s fosfatom A2505.

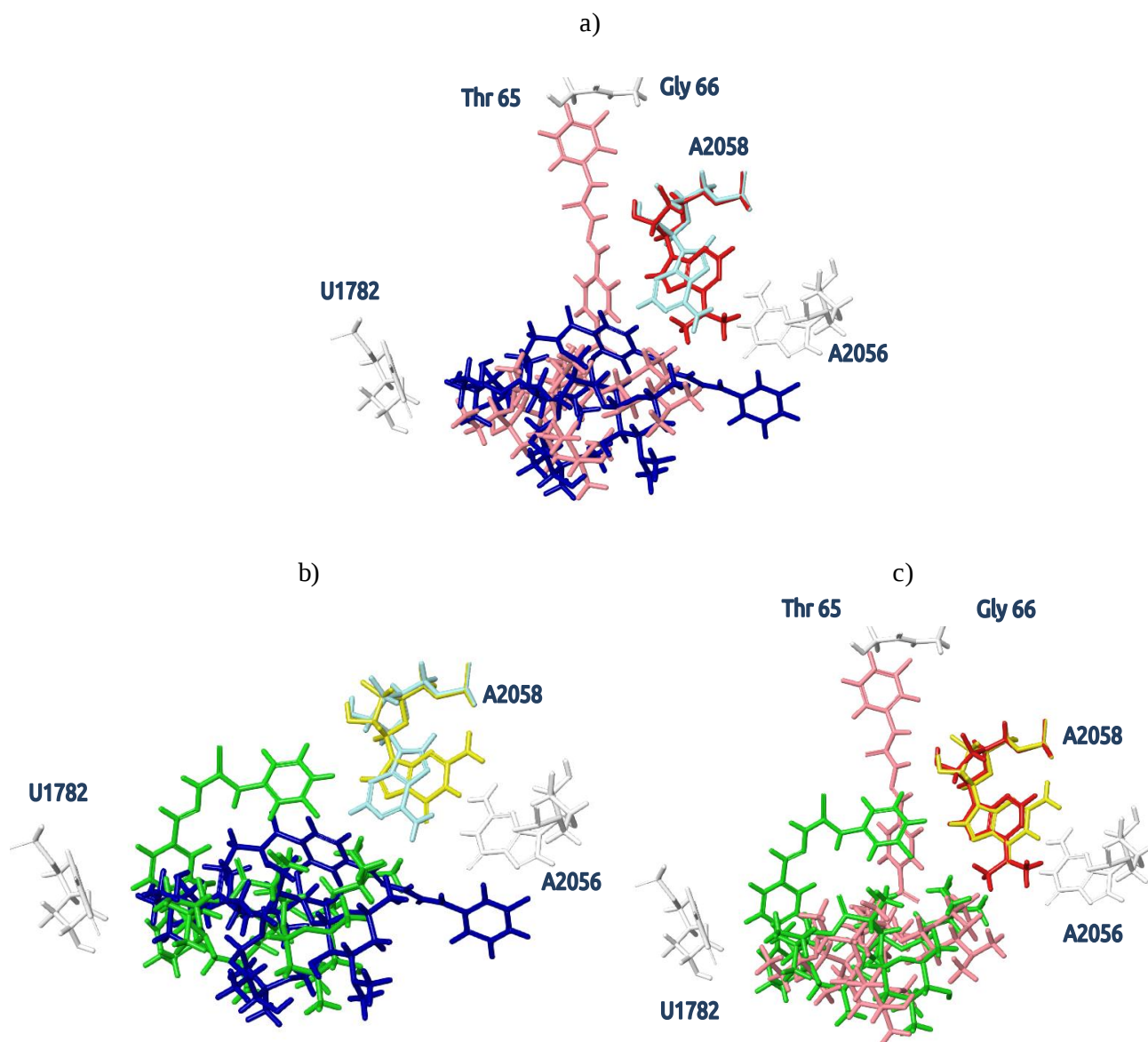


Slika 22. Konformeri najmanje energije dobiveni Monte Carlo simulacijama konformera liganda C* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin b) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi dimetilirani adenin c) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi gvanin. Nukleotidi i aminokiseline ribosoma bakterije *Escherichia coli* su prikazani bijelom bojom.



Slika 23. Geometrija liganda C* i nukleotida na poziciji 2058 23S rRNA ribosoma bakterije *Escherichia coli* dobivena Monte Carlo simulacijama a) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin b) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi dimetilirani adenin c) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi gvanin.

Ukoliko je prilikom Monte Carlo pretrage korišten ligand s istom konformacijom i ribosom s dimetiliranim A2058 dolazi do velikih pomaka semitiokarbazonkog supstituenta (slika 24a). Dobiveni strukturni oblici liganda C* ne stvaraju π -interakcije s dušičnim bazama nukleotida, no dolazi do tvorbe vodikove veze između dušikovog atoma preko kojeg je terminalni fluorobenzenski prsten vezan na semitiokarbazonki supstituent i fosfata nukleotida A2058 (slika 22b i 23b).



Slika 24. Geometrija konformera najmanje energije dobivenih Monte Carlo simulacijama konformera liganda C* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) gdje se na poziciji 2058. 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin (plavo i svjetlo plavo) i gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi dimetilirani adenin (ružičasto i crveno) b) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin i gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi gvanin (zeleno i žuto) c) gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi dimetilirani adenin i gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi gvanin.

Monte Carlo konformacijska pretraga u PTAR-u ribosoma s A2058G supstitucijom rezultirala je konformacijom kod koje je smještaj semitiokarbazonškog supstituenta različit i u odnosu na geometriju liganda u ribosomu s nemetiliranim adeninom na poziciji 2058 i u odnosu na geometriju liganda u ribosomu s dimetiliranim adeninom na poziciji 2058 23S rRNA (slika 24b i 24c). Konformacija liganda C* u ovoj varijanti ribosoma tvori π -interakcije između centralnog benzenskog prstena semitiokarbazonškog supstituenta i nukleotida U1782 te U2609 (slika 22c i 23c). Javlja se i vodikova veza između hidroksilne skupine kladinoze i nukleotida U2506.

Konformacije liganda C* u ribosomu gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin, dimetilirani adenin ili gvanin, a za koje je Monte Carlo metodom izračunata najmanja energija nalaze se unutar energetskog okvira od 0.1 kJ mol^{-1} (tablica 7). Ovo je veoma mala razlika u energiji koja iznenađuje s obzirom na relativno velike konformacijske promjene. Treba međutim primijetiti kako su tijekom Monte Carlo pretrage opisane konformacije pronađene samo 6 puta u slučaju gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi nemetilirani adenin, 3 puta u slučaju gdje se na poziciji 2058 nalazi metilirani adenin i 2 puta prilikom simulacije liganda u PTAR-u gdje se na poziciji 2058 nalazi gvanin. S obzirom na relativno malen broj pronalaska konformera s najmanjom energijom simulacije bi trebalo ponoviti s većim brojem Monte Carlo koraka.

Tablica 7. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada C* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin, dimetilirani adenin ili gvanin.

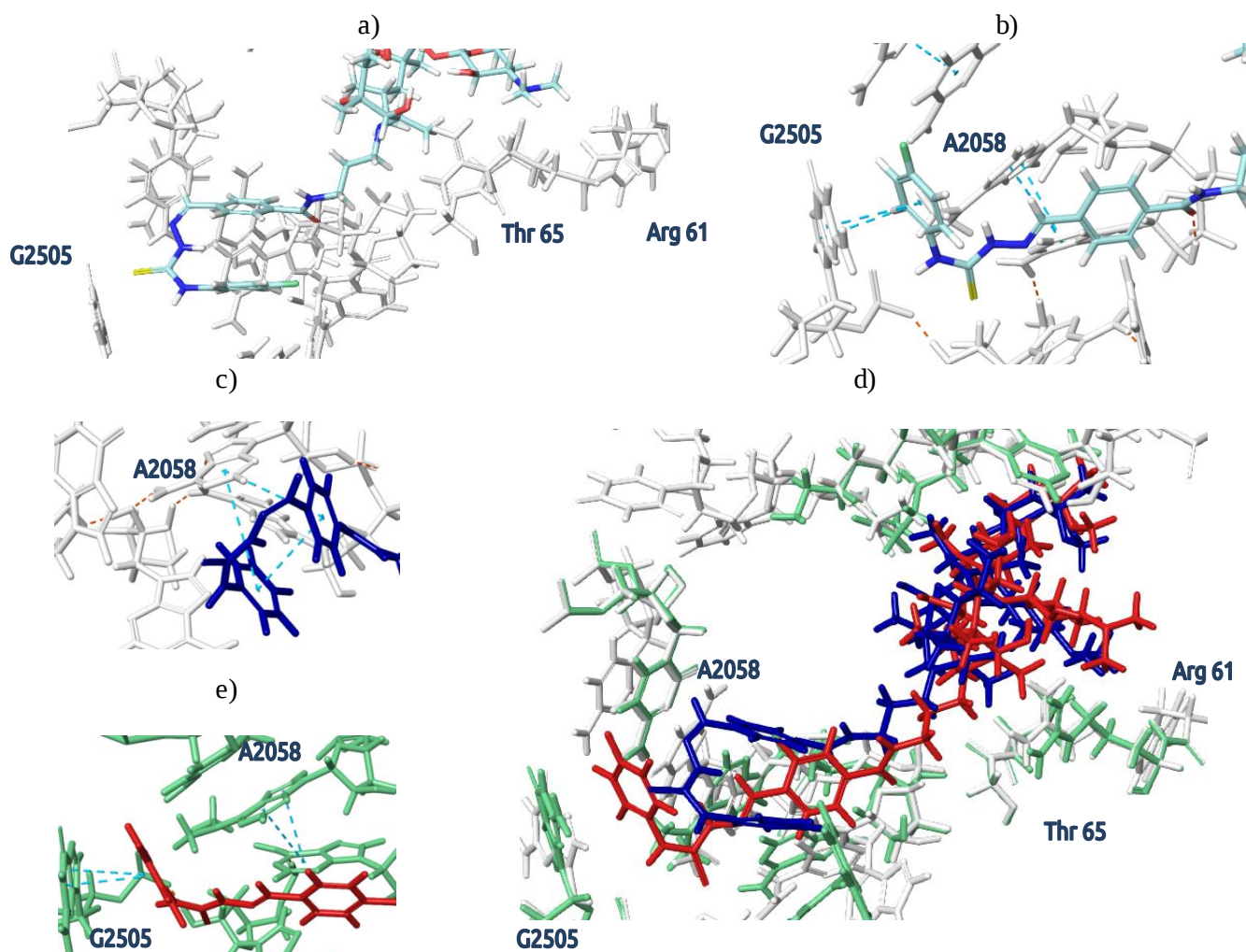
redni broj konformera ^a	ime liganda ^b	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹ ca ^c
1	C*	-137,9
2	C*met	-137,8
3	C*mut	-137,8
4	C*	-135,8
5	C*	-135,6
6	C*mut	-135,4
7	C*	-134
8	C*met	-133
9	C*	-132,9
10	C*met	-132,8
11	C*	-131,1
12	C*mut	-130,9
13	C*	-130,8
14	C*met	-128,6
15	C*	-128,6

^a Svi dobiveni konformeri liganada C, C*, C*met i C*mut su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekulskog uklapanja. Redni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretku. Prikazano je prvih 15 konformera s najnižom energijom.

^b Znak * označava da se ne radi o konformeru koji s obzirom na rezultate molekulskog uklapanja konformacijske pretrage ima najmanju energiju. Znak met označava da je unutar PTAR-a u kojem je provedena Monte Carlo konformacijska pretraga liganda A2058 23S rRNA dimetiliran, dok znak mut označava da je Monte Carlo konformacijska pretraga liganada provedena u PTAR-u s A2058G supstitucijom. Nazivi liganada su objašnjeni u tablici 3.

^c Energetsku razliku između ribosoma s vezanim ligandom u odgovarajućoj konformaciji i ribosoma u kojem nije vezan ligand, pri čemu su oba energetska iznosa izračunata Monte Carlo metodom, označena je s $\Delta\Delta G$.

Monte Carlo konformacijskom analizom liganda D* u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* dobivena je resultantna struktura prikazana na slici 25a, 25c i 25d. Prikazani konformer karakterizira stvaranje intramolekulskih π -interakcija te π -interakcija između purinskog prstena A2058 i oba aromatska prstena koja nalazimo u sastavu semitiokarbazonskog supstituenta liganda D*. Provođenjem Monte Carlo analize s istom početnom strukturom u PTAR-u kojem je nukleotid A2058 dimetiliran resultantni konformeri upućuju na postojanje π -interakcija između fluorobenzenskog prstena semitiokarbazonskog supstituenta i purinskog prstena G2505 (slika 25d i 25e). Pri višim se energijama osim opisane π -interakcije javljaju i π -interakcije između centralnog benzenskog prstena semitiokarbazonskog supstituenta i nukleotida A2058 ili A2059 (slika 25b).



Slika 25. Konformeri dobiveni Monte Carlo simulacijama konformera liganda D* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* a) konformer najmanje energije gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin b) konformer koji ima $0,3 \text{ kJ mol}^{-1}$ veću energiju od energije najpovoljnijeg konformera dobivenog Monte Carlo metodom, a gdje se na poziciji 2058 nalazi metilirani adenin c) nekovalentne interakcije s nukleotidom A2058 kod konformera najmanje energije gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin d) usporedba geometrija vezanja konformera najmanje energije gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin (plavo i bijelo) i konformera najmanje energije gdje se na poziciji 2058 nalazi metilirani adenin (crveno i zeleno) e) nekovalentne interakcije s G2505 kod konformera najmanje energije gdje se na poziciji 2058 23S rRNA nalazi metilirani adenin.

Energija vezanja izračunata Monte Carlo simulacijama kod kojih je ulazna struktura konformacija liganda D* upućuje da se ligand D* jače veže na ribosom ukoliko dolazi do dimetilacije A2058 23S rRNA (tablica 8). Konformacija liganda D* u PTAR-u ribosoma s dimetiliranim A2058 koja ima najnižu energiju je za 5,1 kJ mol⁻¹ stabilnija nego konformacija liganda D s najmanjom energijom izračunatu metodom Monte Carlo.

Tablica 8. Rezultati Monte Carlo konformacijske pretrage liganada D* u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli* gdje se na poziciji 2058 nalazi nemetilirani adenin, dimetilirani adenin ili gvanin.

redni broj konformera ^a	ime liganada ^b	$\Delta\Delta G$ / kJ mol ⁻¹ ^c
1	D*met	-128,5
2	D*met	-127,7
3	D*met	-127,6
4	D*met	-126,6
5	D*met	-125,4
6	D*met	-124,3
7	D*met	-123,6
8	D*met	-123,4
9	D*	-123,4
10	D*met	-123,3
11	D*met	-123,2
12	D*met	-122
13	D*met	-121,4
14	D*met	-121,3
15	D*met	-121,2

^a Svi dobiveni konformeri liganada D* i D*met su poredani s obzirom na porast energije vezanja izračunate metodom molekuskog uklapanja. Redni broj strukture označava položaj pojedinog konformera u ukupnom poretku. Prikazano je prvih 15 konformera s najnižom energijom.

^b Znak * označava da se ne radi o konformeru koji s obzirom na rezultate molekuskog uklapanja konformacijske pretrage ima najmanju energiju. Znak met označava da je unutar PTAR-a u kojem je provedena Monte Carlo konformacijska pretraga liganada A2058 23S rRNA dimetilirani. Nazivi liganada su objašnjeni u tablici 3.

^c Energetsku razliku između ribosoma s vezanim ligandom u odgovarajućoj konformaciji i ribosoma u kojem nije vezan ligand, pri čemu su oba energetska iznosa izračunata Monte Carlo metodom, označena je s $\Delta\Delta G$.

4 Rasprava

4.1 Intramolekulske π -interakcije liganda

Monte Carlo simulacije liganada u različitim modelima otapala rezultirali su različitim izlaznim strukturama. Osim što su dobivene strukture upotrijebljene kako bi se povećala raznolikost početnih konformacija tijekom simulacija molekulskog uklapanja i Monte Carlo (MC) simulacija vezanja liganda na receptor, konformacije dobivene Monte Carlo simulacijama u otapalu mogu dati uvid u intramolekulske nekovalentne interakcije koje postoje kod liganada u otapalu i mogu značajno utjecati na termodinamiku vezanja na receptor. U sklopu ovog istraživanja posebno je bilo bitno razmotriti dolazi li do stvaranja π -interakcija između centralnog benzenskog prstena i terminalnog aromatskog prstena semitiokarbazonkog supstituenta. Naime, ukoliko ligandi tvore intramolekulske π -interakcije između navedenih dijelova liganada, tada je otežano stvaranje interakcija naslagivanja s aromatskim skupinama koje nalazimo u PTAR-u ribosoma bakterije *Escherichia coli*. Izuzetak od ovog pravila je ligand D koji unatoč tome što tvori intramolekulske interakcije tvori i π -interakcije s purinskim prstenom A2058 23S rRNA.

Tijekom Monte Carlo konformacijske pretrage liganada u otapalu intramolekulske π -interakcije su pronađene kod liganada A, C, D, M, P i R, dok su tijekom simulacija liganada u kompleksu s ribosomom intramolekulske π -interakcije primijećene kod liganada A, D i M. Ligandi A i D prilikom konformacijske pretrage u otapalu, intramolekulske π -interakcije stvaraju kod konformacija s višom energijom, dok kod liganda M intramolekulske π -interakcije nalazimo kod konformera nižih energija. Navedene interakcije kod liganada A i D nisu pronađene molekulskim uklapanjem, dok kod liganda M jesu, vjerojatno zbog toga što su se pokazale izuzetno stabilne. Međutim, treba primijetiti da ligandi C, P i R ne tvore intramolekulske π -interakcije usprkos tome što ih nalazimo kod konformera pronađenih Monte Carlo pretragom liganada u otopini.

4.2 Utjecaj funkcionalnih skupina ribosoma na vezanje liganada

Rezultati ovog istraživanja su potvrdili su da se molekule s veoma malom razlikom u strukturi mogu značajno razlikovati s obzirom na način i mjesto vezanja. Najbolji primjer za ovo su ligandi C i D koji se međusobno razlikuju samo u položaju fluora na terminalnom fluorobenzenskom prstenu semitiokarbazonkog supstituenta, no posjeduju različitu energiju vezanja, tvore različite interakcije i samim time posjeduju različiti inhibitorni učinak.

Najfleksibilniji strukturni dio liganada je semitiokarbazonski supstituent koji se između različitih liganada primarno razlikuje s obzirom na terminalni aromatski prsten. Ligandi koji na tom prstenu nemaju ili imaju malo hidrofilnih grupa su ligandi A i E. Oba liganda s nukleotidima ribosoma tvore π -interakcije naslagivanja i popunjavaju hidrofobne šupljine koje su daleko od mjesta gdje je smješten laktonski prsten. Ligandi C i D na terminalnom benzenskom prstenu imaju fluor u orto, odnosno para položaju, no niti u jednoj konformaciji nije pronađena halogenska veza. Unatoč očekivanju, ligandi koji kao terminalne skupine semitiokarbazonkog supstituenta imaju dušične baze ne tvore Watson Crickove parove baza, ali tvore π -interakcije koje su nerijetko usmjerene vodikovim vezama. Uklanjanje kladinoze iz laktonskog prstena je kod liganda G rezultiralo relativno nespecifičnim vezanjem. Iako zamjena kladinoze s karbonilnim kisikom poboljšava inhibitorni učinak ketolida, uklanjanje kladinoze onemogućuje nastanak mnogih hidrofobnih interakcija i vodikovih veza koje kladinoza ostalih liganada tvori nukleotidima i aminokiselinama u PTAR-u.

4.3 Vezanje liganada u najužem dijelu izlaznog kanala PTAR-a

Nukleotidi U790, U2441 i C2443 te aminokiseline Lys63 i Gly 64 tvore najuži dio izlaznog kanala PTAR-a. Vezanje azitromicina u ovom dijelu ribosoma opisano je za kristalnu strukturu ribosoma bakterije *Deinococcus radiodurans* (Schlunzen i sur. 2003). Međutim, eksperimentalni dokazi pokazali su kako je ovaj oblik vezanja vjerojatno prisutan samo u kristala te da ukoliko dolazi do ovakvog oblika vezanja u fiziološkim uvjetima da se radi o *Deinococcus radiodurans* specifičnom fenomenu. Međutim, iako kristalizacijski uvjeti nisu vjerodostojni model za opis veznih mjesta antibiotika, ova alternativna vezna mjesta koja se javljaju pri nižim energijama sustava mogu upućivati na potencijalne oblike vezanja koja možemo očekivati za razne strukturne oblike novih antibiotika.

U sklopu ovog istraživanja na opisani dio izlaznog kanala se vežu ligandi B, C, D, P i R. Vezanje liganda B je bitno različito od vezanja azitromicina i ostalih liganada s obzirom na to da samo semitiokarbazonski supstituent liganda B ulazi u kanal. Energija karakteristična za ovaj oblik vezanja je relativno visoka i ligand B stoga nije optimalni strukturni oblik antibiotika. Konformeri liganda C odlikuju se niskom energijom vezanja što ih čini dobrim potencijalnim inhibitorom translacije. Vezanje liganda C na ovaj dio PTAR-a usmjereno je vodikovim vezama, dok u vezanju liganda D primarno sudjeluju hidrofobne interakcije laktonskog prstena. Ligandi P i R ne tvore bliske interakcije s nukleotidima i aminokiselinama u kanalu što se može vidjeti i iz energije vezanja.

Svi navedeni ligandi imaju identičnu strukturu makrolaktonskog prstena i razlikuju se samo u građi terminalnog dijela semitiokarbazonskog supstituenta. Unatoč razlikama terminalne aromatske skupine liganada C, D, P i R su relativno male ukoliko ih usporedimo s purinskim prstenom liganda M. Ligandi P i R imaju mnogo polarnih skupina dok ligandi C i D na aromatski prsten imaju vezan atom elementa s najvećom elektronegativnošću u periodnom sustavu. Ovo su obilježja zbog kojih se navedeni aromatski prstenovi rijetko nalaze u uskim hidrofobnim šupljinama koje nalazimo u ribosomu, već preferirano tvore π -interakcije u onim dijelovima ribosoma gdje ne nalazimo mnogo steričkih smetnji. Takva mjesta nalaze se pretežito oko dijela PTAR-a gdje se dokazano vežu eritromicin i azitromicin. Zbog toga se ligandi koji na terminalnom aromatskom prstenu imaju polarne grupe preferirano vežu laktonskim prstenom u najuži dio izlaznog kanala PTAR-a.

4.4 Utjecaj metilacije nukleotida A2058 23S rRNA i A2058G supstitucije na vezanje liganada A i C

Varijabilnost nukleotida na poziciji 2058 23S rRNA primarni je uzrok selektivnosti djelovanja makrolidnih antibiotika kao što su azitromicin i eritromicin, no metilacija adenina koji se na ovoj poziciji nalazi kod patogenih bakterijskih sojeva divljeg tipa dovodi do razvoja rezistencije na klinički uobičajene makrolidne antibiotike. Idealni antibiotik bi se stoga trebao velikim afinitetom vezati i u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* koja na poziciji 2058 ima nemetilirani i u PTAR bakterije koja na navedenoj poziciji ima metilirani adenin. Vezanje liganada u PTAR ribosoma kod kojeg se na poziciji 2058 poželjno je ukoliko se antibiotikom tretiraju sojevi bakterija koji kao rezistencijski mehanizam uvode A2058G mutaciju, no istovremeno je ovo problem zbog toga što se na ekvivalentnoj poziciji humanih ribosoma također nalazi gvanin. Iako su PTAR-ovi humanih i bakterijskih ribosoma slični u građi, kumulativni zbroj malih energetske razlika može uzrokovati veliku razliku u afinitetu vezanja i stoga bi bilo poželjno za ligande simulirane u bakterijskom PTAR-u napraviti i simulacije vezanja u PTAR-u humanih ribosoma.

Simulacije liganada A, C i D u ribosomu bakterije *Escherichia coli* s dimetiliranim adeninom na poziciji 2058 ili s uvedenom A2058G supstitucijom pokazali su kako navedena promjena može uzrokovati strukturne promjene što možemo vidjeti na primjeru liganada A i C. Vezanje liganada A na nukleotid A2058 postiže se vodikovim vezama, a vezanje na ribozu navedenog nukleotida očuvano je u sva tri modela ribosoma. Iako prilikom metilacije i supstitucije A2058 dolazi do prekida vodikove veze između dušične baze nukleotida i laktoznog prstena, energija kompleksa liganada A u ribosomu s metiliranim ili supstituiranim A2058 (stavite ovdje iznos energije) je manja nego energija kompleksa liganada A i ribosoma s nemetiliranim adeninom na poziciji 2058 (stavite ovdje iznos energije). Međutim, velik afinitet vezanja liganada A u PTAR ribosoma s A2058G mutacijom označava da bi ovaj ligand potencijalno mogao inhibirati translaciju u eukariotskim ribosomima.

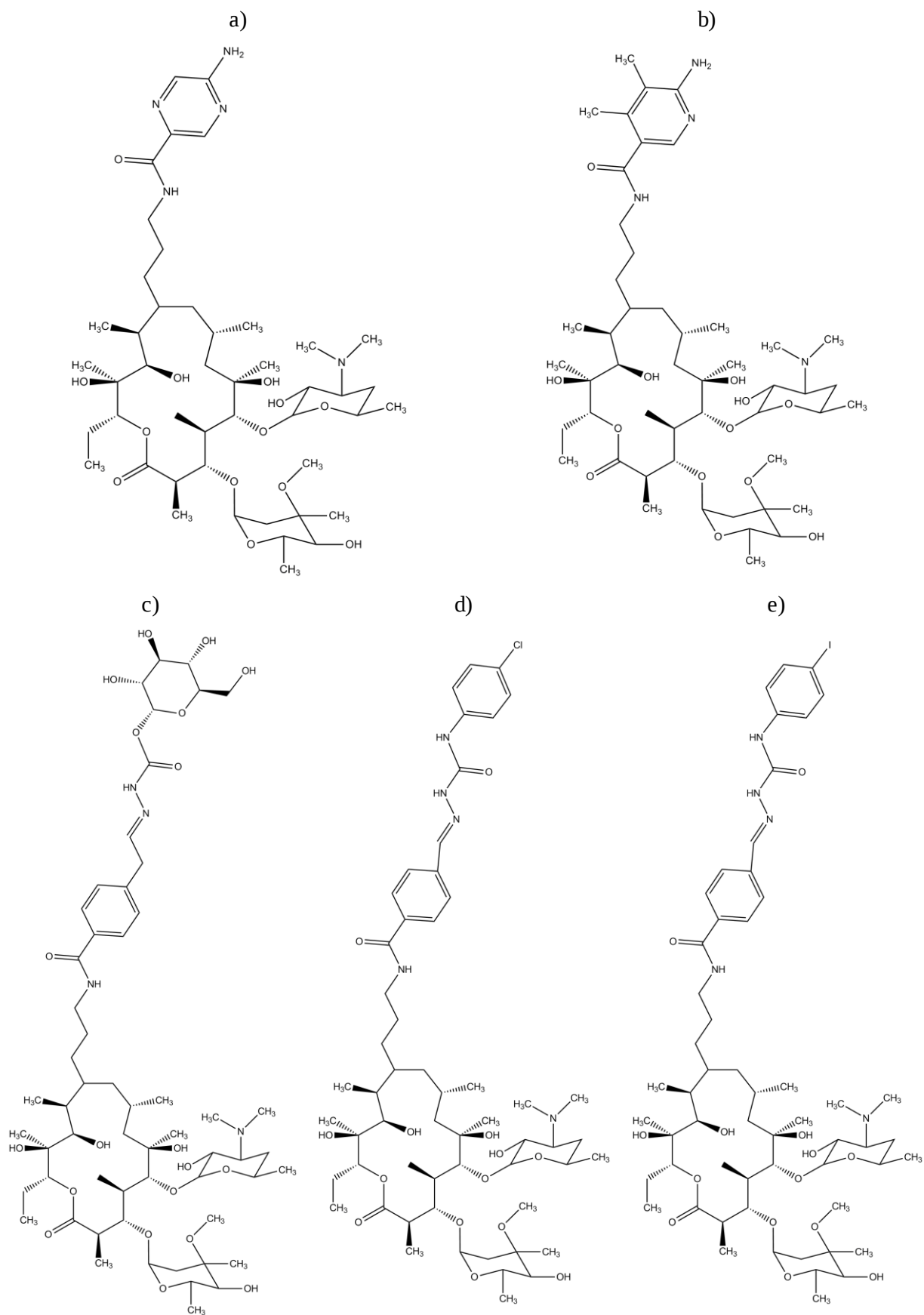
Ligand C s nukleotidom A2058 tvori π -interakcije koje se gube prilikom metilacije navedenog nukleotida te dolazi do tvorbe vodikovih veza između dušika semitiokarbazonskog supstituenta i A2058. Prilikom supstitucije A2058G ligand C tvori π -interakcije s dušičnim bazama U1782 i U2609. Ovi nukleotidni ostaci su evolucijsko očuvani te ih nalazimo i u ribosomima bakterije *Escherichia coli* i u PTAR-u humanih ribosoma. Ovaj tip nekovalentnog vezanja nije specifičan samo za patogene bakterije, što skupa s činjenicom da se energetske najpovoljnije konformere liganda C u sve tri varijante ribosoma nalaze unutar energetskog okvira od $0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$, čini ligand C lošim potencijalnim antibiotikom.

Ligand D se u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* veže putem makrolaktonskog prstena, ali i semitiokarbazonskog supstituenta. Makrolaktonski prsten se pritom veže u najuži dio izlaznog kanala PTAR-a gdje stvara hidrofobne interakcije s okolnim nukleotidima i aminokiselinama. Centralni benzenski i terminalni fluorobenzenski prstenovi semitiokarbazonskog supstituenta tvore intramolekulske π -interakcije s purinskim prstenom A2058. Ukoliko se ovaj nukleotid metilira terminalni fluorobenzenski prsten tvori π -interakcije s nukleotidom G2505, a pri višim energijama i s nukleotidima A2058 ili A2059. Pored toga, razlika u potencijalnoj energiji između najstabilnije konformacije liganda D u ribosomu s nemetiliranim A2058 i u ribosomu s metiliranim A2058 iznosi $5,1 \text{ kJ/mol}$. S obzirom na potencijalnu energiju i očuvanost vezanja na A2058 i nakon što je spomenuti nukleotid metiliran ligand D najbolji je potencijalni kandidat za razvoj novih antibiotika neosjetljivih djelovanje metiltransferaza Erm. Međutim, treba imati na umu da u ovom istraživanju nije istražena geometrija liganda D u ribosomu u kojem se na poziciji 2058. nalazi gvanin umjesto adenina. Također bi bilo poželjno ispitati vezanje liganda D u eukariotski ribosom kako bi se utvrdila specifičnost djelovanja liganda D u inhibiranju translacije kod prokariotskih organizama.

4.5 Prijedlozi za daljnja istraživanja

Simulacije vezanja strukturnih derivata azitromicina u PTAR bakterije *Escherichia coli* daju uvid u konformacijsku raznolikost i oblike nekovalentnog vezanja liganada u ribosom bakterija divljeg tipa i ribosom bakterija kod kojih su nukleotidi promijenjeni na taj način da omogućuju rezistenciju patogenih sojeva prokariota na makrolide. Ligandi korišteni u ovom istraživanju su kompleksne građe i posjeduju velik broj torzijskih kuteva. Primijećena je velika raznolikost izlaznih konformacija dobivenih molekulskim uklapanjem što, skupa sa zapažanjem da rezultatni konformeri Monte Carlo analize veoma ovise o početnoj strukturi, sugerira da bi u budućim istraživanjima bilo poželjno izlazne konformere dobivene metodom molekulskog uklapanja grupirati s obzirom na RMSD i potom predstavnike grupa koristiti kao početne strukture za Monte Carlo analizu. Kao što je već napomenuto sve ligande koji su korišteni u tijeku ovog istraživanja bilo bi poželjno simulirati u PTAR-u humanog citoplazmatskog i mitohondrijskog ribosoma.

Fleksibilnost semitiokarbazonkog supstituenta omogućuje stvaranje mnogi nekovalentnih interakcija koje ligand ne bi mogao tvoriti da supstituent ima manju konformacijsku slobodu. Međutim, velika fleksibilnost kao posljedicu ima i relativno neselektivno vezanje. Manji supstituenti na atomu N10 koji imaju donorsko-akceptorski potencijal mogli bi se selektivnije vezati u PTAR ribosoma (slika 26a). Terminalni aromatski prstenovi istraživanih liganada imali su pretežito hidrofilne ili pretežito hidrofobne grupe. Mnoge regije PTAR-a imaju potencijal i za stvaranje hidrofobnih interakcija i vodikovih veza te bi terminalni aromatski prstenovi budućih liganada mogli vezati i hidrofobne i hidrofilne skupine (slika 26b). Zamjena terminalnog aromatskog prstena semitiokarbazonkog supstituenta s fleksibilnijim glukoznim prstenom moglo bi rezultirati jačim vezanjem između PTAR-a i liganda (slika 26c). I za kraj, iako su ligandi s terminalnim fluorobenzenskim prstenom rezultirali najpoželjnijim oblikom vezanja liganda u PTAR, uvođenje polarizabilnijih halogenih atoma kao što su klor (slika 26 d) ili jod (slika 26 e) moglo bi dovesti do efikasnijih oblika vezanja.



Slika 26. Prijedlog novih strukturnih varijanti azitromicinskih derivata za buduća istraživanja vezanja liganada u PTAR bakterije *Escherichia coli*.

5 Zaključak

Istraživanje vezanja strukturnih derivata azitromicina u PTAR ribosoma bakterije *Escherichia coli* pokazalo je kako mnogi ligandi koji sadrže bar dva aromatska prstena mogu tvoriti π -interakcije, kako u raznim modelima otapala, tako i unutar PTAR-a. Ukoliko ligand tvori intramolekulske π -interakcije u PTAR-u ribosoma, u pravilu je otežano stvaranje π -interakcija između dušičnih baza rRNA i aromatskih skupina liganada. Iznimka od ovog pravila je ligand D koji unatoč tome što tvori intramolekulske π -interakcije između centralnog benzenskog i terminalnog fluorobenzenskog prstena semitiokarbazonkog supstituenta, π -interakcije tvori i s purinskim prstenom nukleotida A2058 23S rRNA. Uslijed dimetilacije nukleotida A2058 fluorobenzenski prsten stvara π -interakcije s G2505, a rjeđe i s dimetiliranim A2058 ili A2059.

Laktonski prsten liganda D smješten je u neposrednoj blizini najužeg dijela izlaznog kanala PTAR-a te tvori hidrofobne interakcije s aminokiselinama Lys 90, Lys 91 i Arg 92, te nukleotidom A751. Sličan način vezanja pronađen je i rentgenskog strukturnom analizom kristala ribosoma bakterije *Deinococcus radiodurans* kojem je u PTAR-u vezan azitromicin. S obzirom na to da kompleks liganda D u PTAR-u s dimetiliranim A2058 ima nižu energiju vezanja nego ligand D vezan u PTAR s A2058 koji nije metiliran, te s obzirom na to da se laktonski prsten liganda D zatvara najuži dio izlaznog kanala PTAR-a, računalni rezultati ukazuju na ligand D kao ligand s najvećim potencijalom za antimikrobna svojstva od svih liganada čije je vezanje istraženo u sklopu ovog diplomskog rada.

6 Popis literature

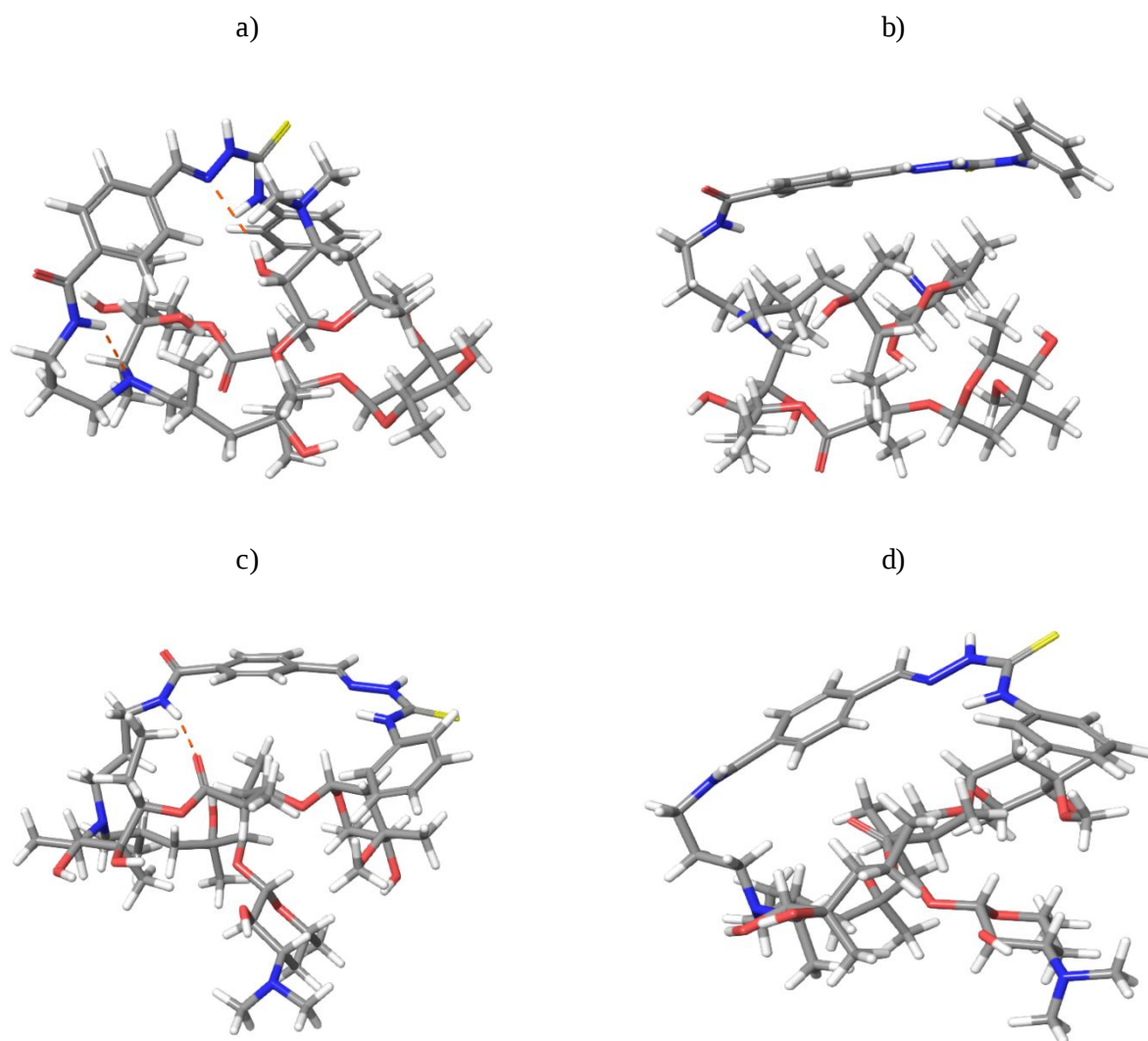
- Abraham, M. J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J. C., Hess, B., Lindahl, E. 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. **1(2)**,19–25.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., Steitz, T.A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science*. **289(5481)**, 905-920.
- Banks, J.L., Beard, H.S., Cao, Y., Cho, A.E., Damm, W., Farid, R., Felts, A.K., Halgren, T.A., Mainz, D.T., Maple, J.R., Murphy, R., Philipp, D.M., Repasky, M.P., Zhang, L.Y., Berne, B.J., Friesner, R.A., Gallicchio, E., Levy, R.M. 2005. Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J. Comp. Chem.* **26**, 1752.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. 2002. Biochemistry. New York: W.H. Freeman.
- Birte, V. i Stephen. D. 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1-12.
- Bonnefoy, A., Girard, A.M., Agouridas, C., Chantot, J.F. 1997. Ketolides lack inducibility properties of MLS(B) resistance phenotype. *J. Antimicrob. Chemother.* **40**, 85–90.
- Bulkley, D., Innis, C.A., Blaha, G., Steitz, T.A. 2010. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *PNAS*. **107(40)**, 17158-17163.
- Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.Q., Kollman, P.A. 1995. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117(19)**, 5179–5197.
- de Vaca, I.C., Lucas, M.F., Guallar, V. 2015. New Monte Carlo Based Technique To Study DNA–Ligand Interactions. *J. Chem. Theory Comput.* **11(12)**, 5598–5605.
- Dunkle, J.A., Xiong, L., Mankin, A.S., Cate, J.H.D. 2010. Structures of the *Escherichia coli* ribosome with antibiotics bound near the peptidyl transferase center explain spectra of drug action. *Biophysics and Computational Biology*. **107(40)**, 17152-17157.
- Erlacher, M. D., Lang, K., Shankaran, N., Wotzel, B., Huttenhofer, A., Micura, R., Mankin, A. S., Polacek, N. 2005. Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2'-hydroxyl group of A2451. *Nucleic Acids Res.* **33**, 1618–1627.

- Gregory, S. T., Dahlberg, A. E. 1999. Erythromycin resistance mutations in ribosomal proteins L22 and L4 perturb the higher order structure of 23 S ribosomal RNA. *J Mol Biol.* **289**, 827–834.
- Hanwell, M.D., Curtis, D.E., Lonie, D.C., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G.R. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform
- Hufnagel, D. A., DePas, W. H. i Chapman, M. R. 2015. The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix. *Microbiol Spectr.* doi: 10.1128/microbiolspec.MB-0014-2014.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D.S., TiradoRives, J. 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236.
- Jorgensen, W.L., Maxwell, D.S., Tirado-Rives, J. 1996. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118 (45)**, 11225–11236.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. New York: Worth Publishers.
- Melnikov, S., Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M. 2012. One core, two shells: bacterial and eukaryotic ribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* **19(6)**, 560-567.
- Morozumi, M., Takahashi, T., Ubukata, K. 2010. Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: Characteristics of isolates and clinical aspects of community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother.* **16**, 78–86.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J. 1999. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of computational chemistry.* **19**, 1639-1662.
- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. , Olson, A. J. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry.* **16**, 2785-2791.
- Oliynyk, M., Samborsky, M., Lester, J.B., Mironenko, T., Scott, N., Dickens, S., Haydock, S.F., Leadlay, P.F. 2007. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol.* **25(4)**, 447-53.
- Parnham, M.J., Erakovic Haber, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Perletti, G., Verleden, G.M., Vos R. 2014. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacol Ther.* **143(2)**, 225-245.

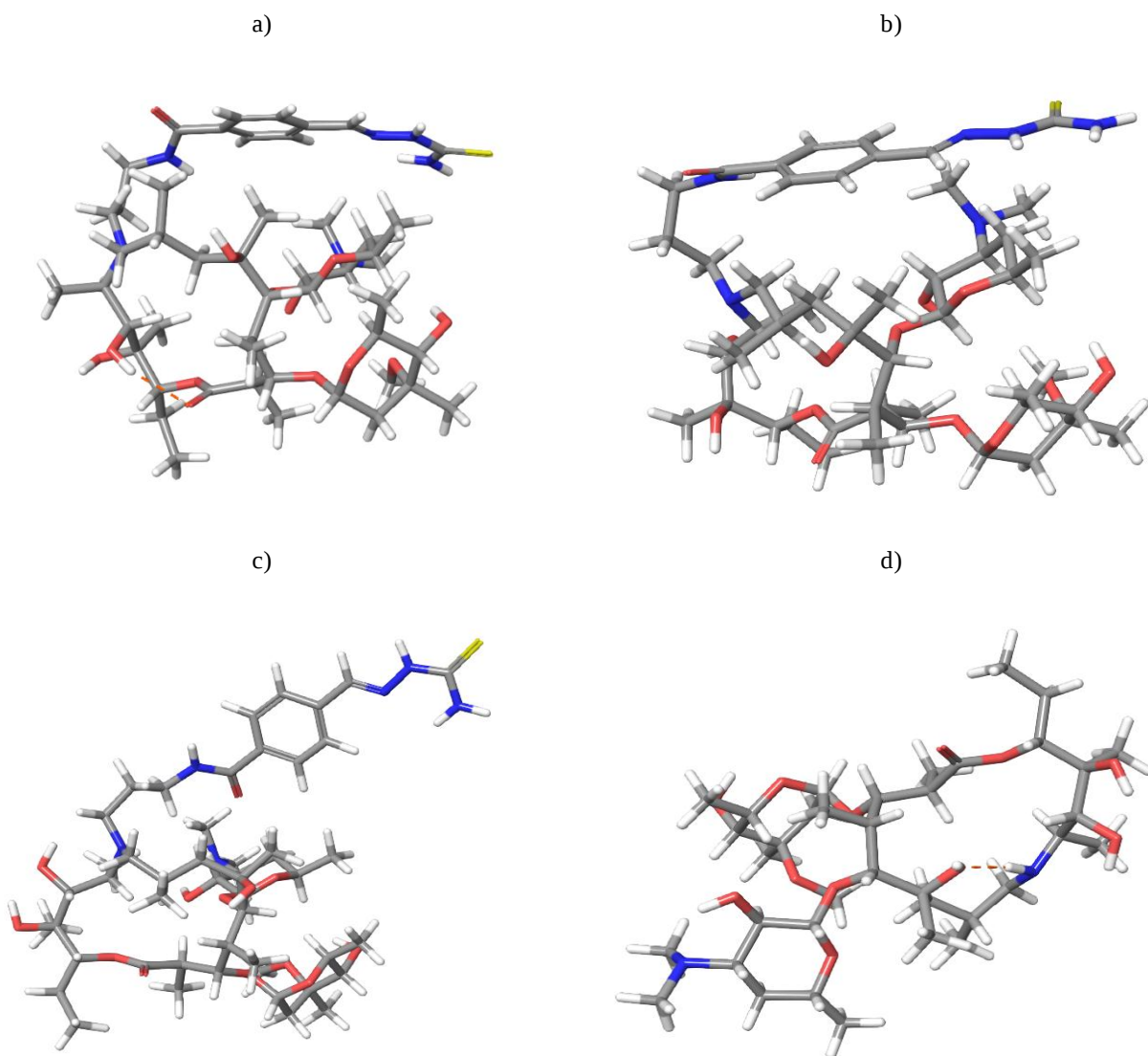
- Poehlsgaard, J., Douthwaite, S. 2003. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. *Curr Opin Investig Drugs*. **4(2)**, 140-148.
- Polacek, N., Mankin, A.S. 2008. The Ribosomal Peptidyl Transferase Center: Structure, Function, Evolution, Inhibition. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **40(5)**, 285-311.
- preuzeto sa: <https://www.schrodinger.com/science-articles/force-field>, Schrödinger, LLC, datum: 5.5.2018.
- Ramakrishnan, V. 2002. Ribosome Structure and the Mechanism of Translation. *CellPress*. **108(4)**, 557-572.
- Rohs, R., Bloch, I., Sklenar, H., Shakked, Z. 2005. Molecular flexibility in ab initio drug docking to DNA: binding-site and binding-mode transitions in all-atom Monte Carlo simulations. *Nucleic Acids Res*. **33(22)**, 7048-7057.
- Rowe, R.K., Ho, P.S. 2017, Relationships between hydrogen bonds and halogen bonds in biological systems. *Acta Cryst*. **B73**, 255–264.
- Samaha, R. R., Green, R., Noller, H. F. 1995. A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature*. **377**, 309–314.
- Schlunzen, F., Harms, J. M., Franceschi, F., Hansen, H. A. S., Bartels, H., Zarivach, R. i suradnici. 2003. Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure*. **11(3)**, 329-338.
- Schrödinger Release 2018-1: MacroModel, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
- Schrödinger Release 2018-1: Schrödinger Suite 2018-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018; Prime, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2017.
- Sherer, E.C. 2010. Antibiotics Targeting the Ribosome. *Annual Reports in Computational Chemistry*. **6**, 139-166.
- Shivakumar, D., Williams, J., Wu, Y., Damm, W., Shelley, J., Sherman, W. 2010. Prediction of Absolute Solvation Free Energies using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J. Chem. Theory Comput*. **6(5)**, 1509–1519.
- Sondergaard, C.R., Olsson, M.H.M., Rostkowski, M., Jensen, J.H. 2011. Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. *Journal of Chemical Theory and Computation*. **7**, 2284-2295.
- Tu, D., Blaha, G., Moore, P.B., Steitz, T.A. 2005. Structures of MLSBK antibiotics bound to mutated large ribosomal subunits provide a structural explanation for resistance. *Cell*. **121**, 257–270.

- Wang, J., Wang, W., Kollman P. A., Case, D. A. **2006**. Automatic atom type and bond type perception in molecular mechanical calculations. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 25, 247-260.
- Weisblum, B. 1998. Macrolide resistance. *Drug Resistance Updates*. **1**, 29–4.1
- Wilks, J.C., Slonczewski, J.L. 2007. pH of the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*: Rapid Measurement by Green Fluorescent Protein Fluorimetry. *Journal of Bacteriology*. **189(15)**, 5601-5607.
- Youngman, E. M., Brunelle, J. L., Kochaniak, A. B., Green, R. 2004. The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell*. **117**, 589–599.
- Zielkiewicz, J. 2005. Structural properties of water: Comparison of the SPC, SPCE, TIP4P, and TIP5P models of water. *J. Chem. Phys.* **123 (10)**, 104501.

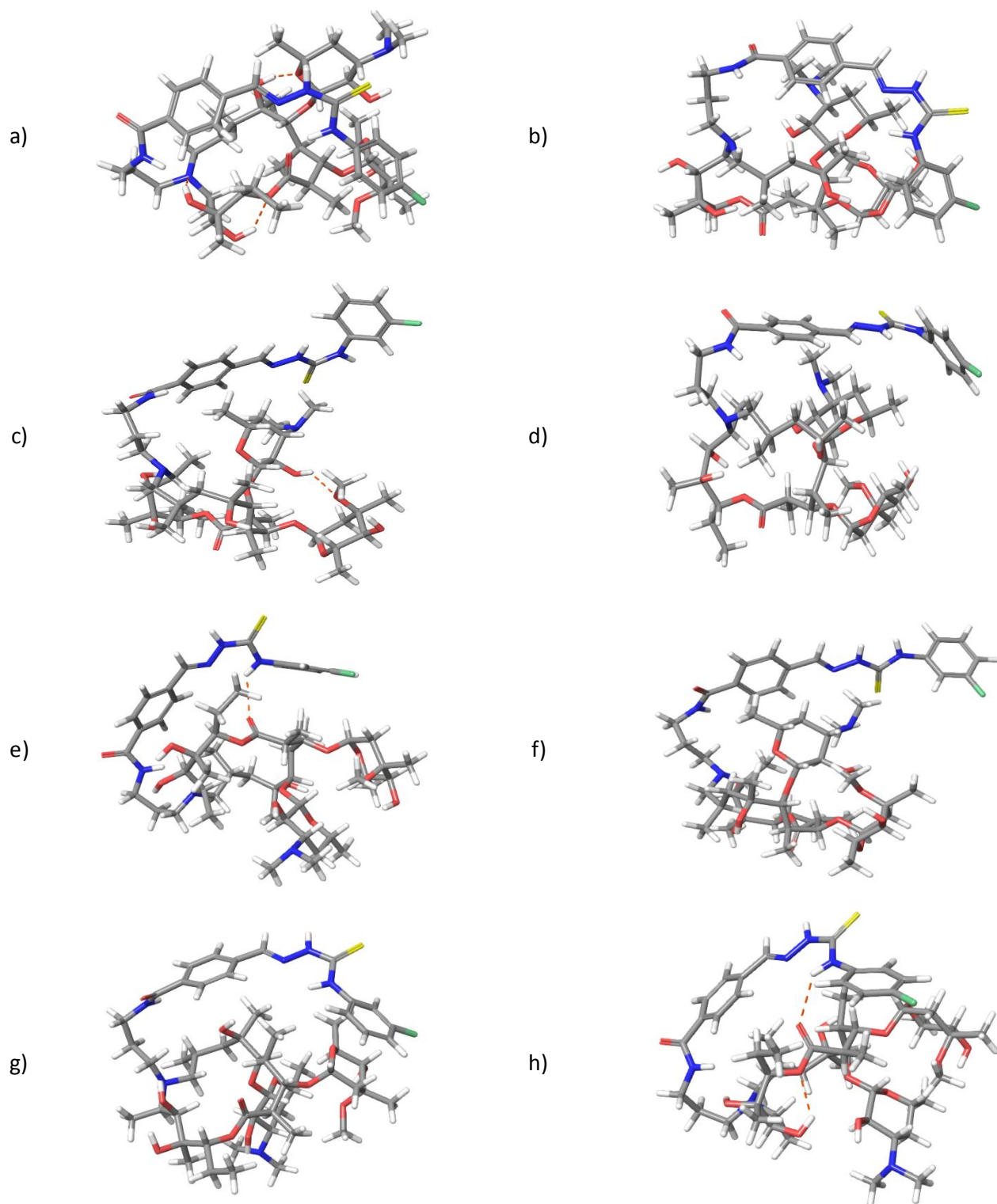
7 Dodatak



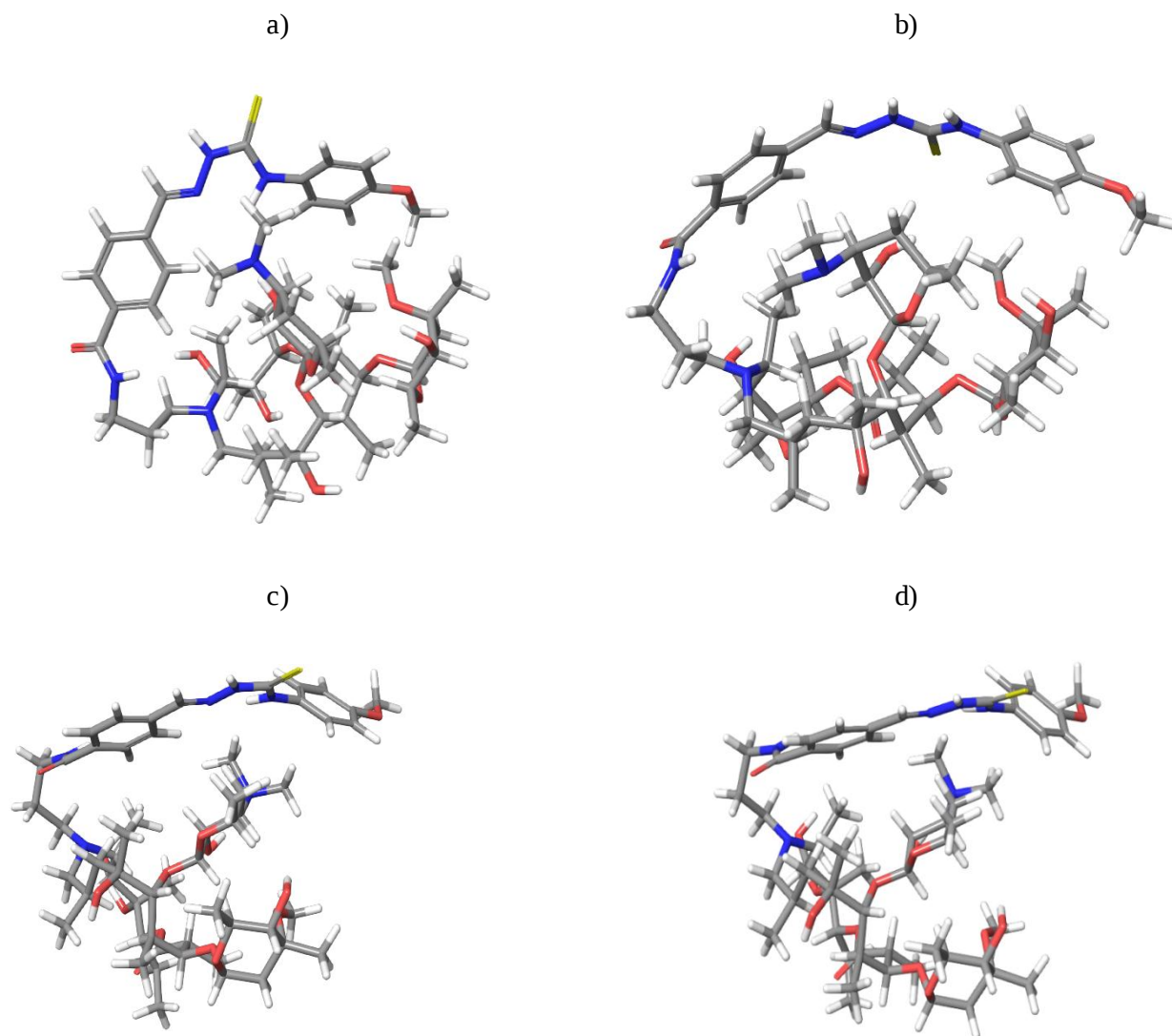
Slika 27. Konformeri najniže energije liganda A dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



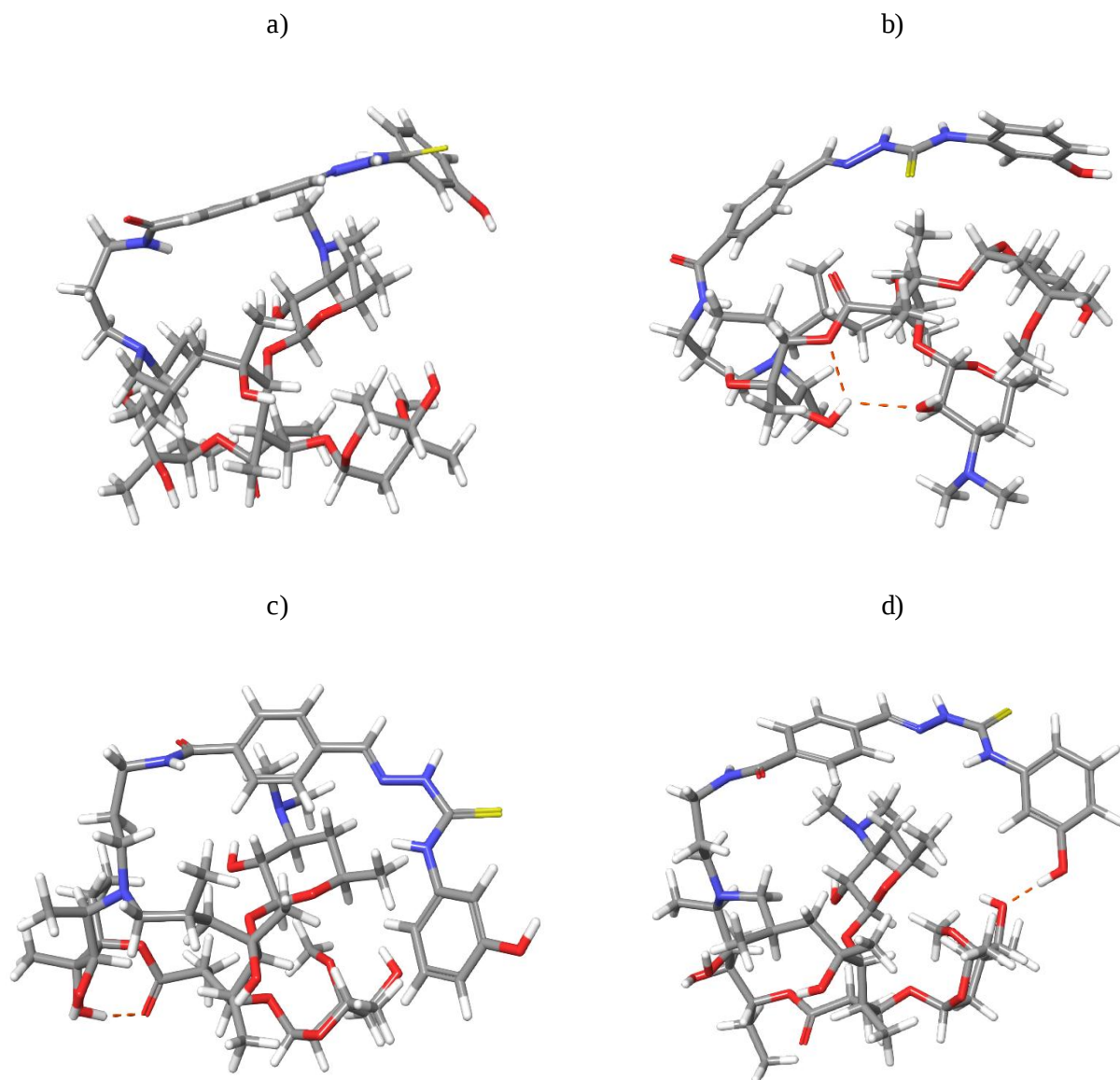
Slika 28. Konformeri najniže energije liganda B dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



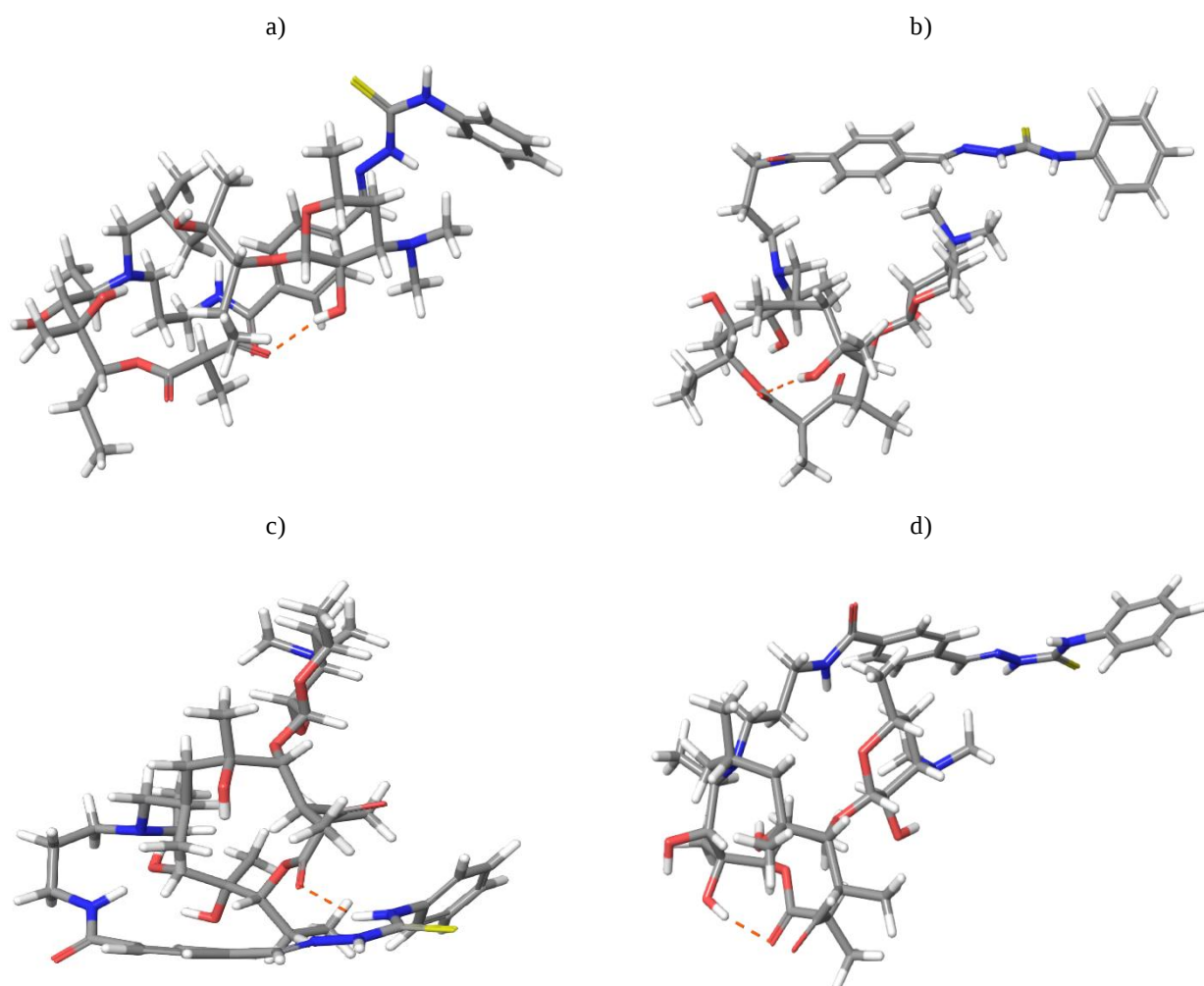
Slika 29. Konformeri najniže energije dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) liganda C u mediju dielektrične konstante 4 b) liganda D u mediju dielektrične konstante 4 c) liganda C u mediju dielektrične konstante 81 d) liganda D u mediju dielektrične konstante 81 e) liganda C u implicitnom modelu oktanola f) liganda D u implicitnom modelu oktanola g) liganda C u implicitnom modelu vode h) liganda D u implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



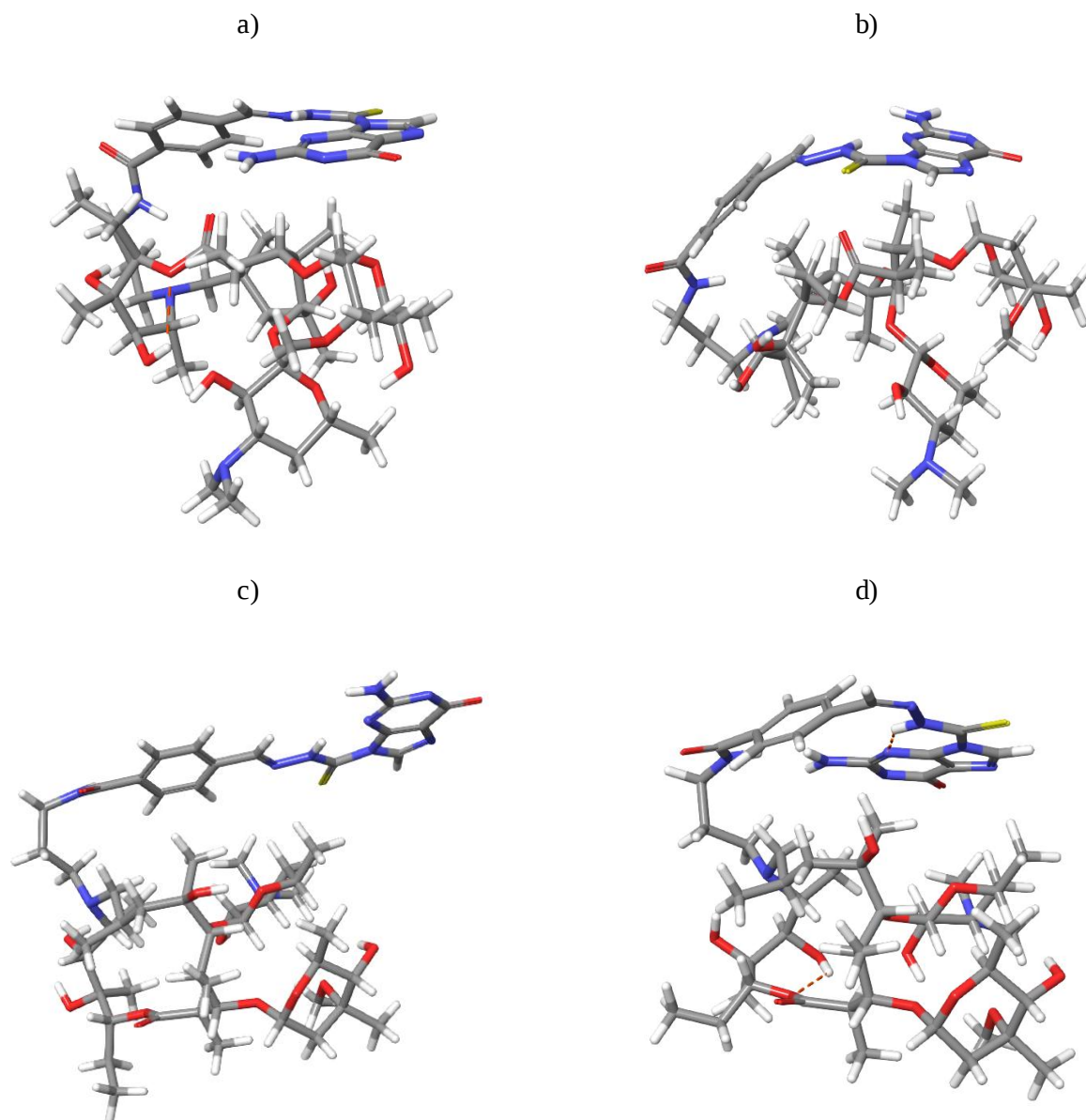
Slika 30. Konformeri najniže energije liganda E dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



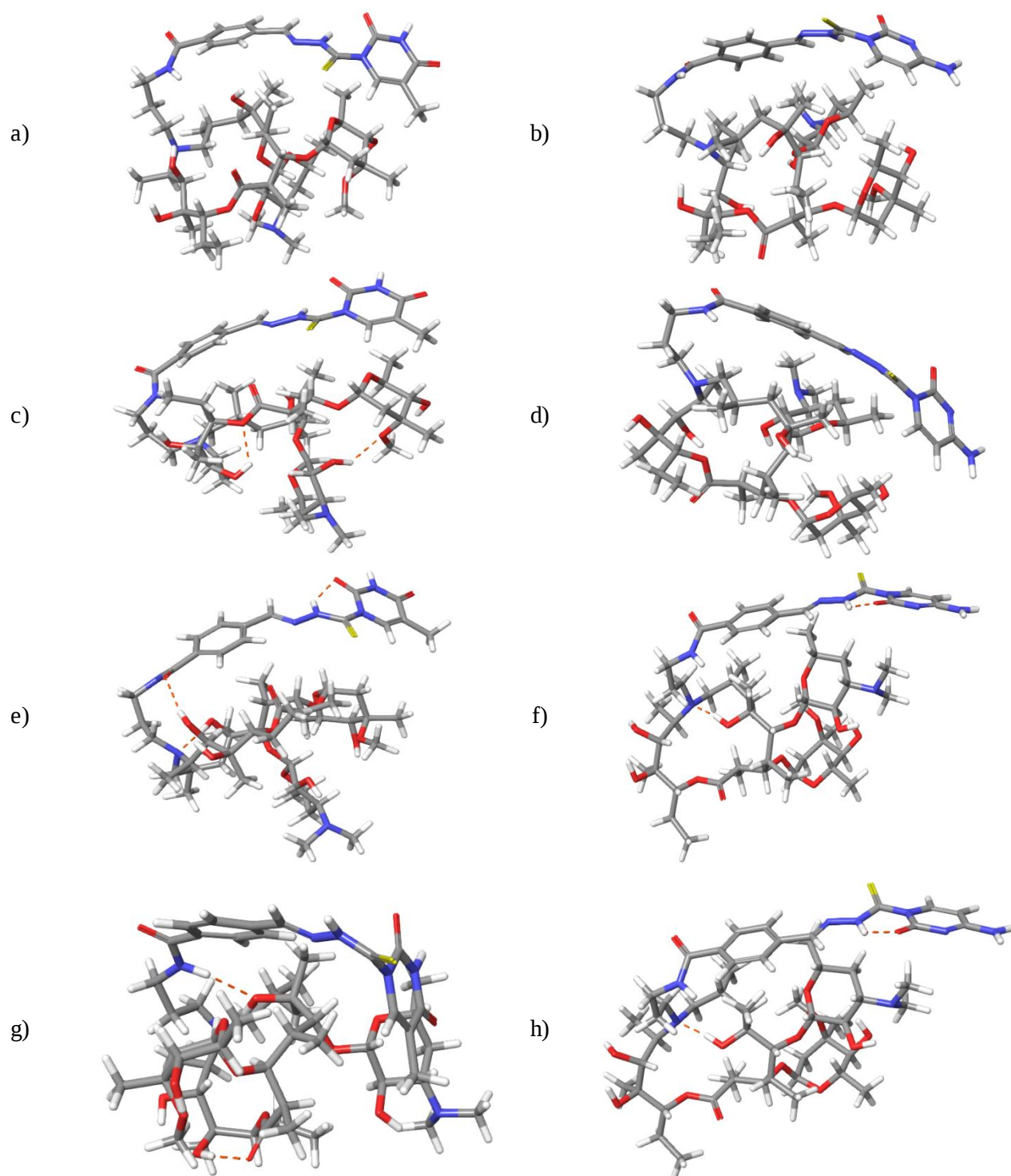
Slika 31. Konformeri najniže energije liganda F dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



Slika 32. Konformeri najniže energije liganda G dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



Slika 33. Konformeri najniže energije liganda M dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) mediju dielektrične konstante 4 b) mediju dielektrične konstante 81 c) implicitnom modelu oktanola d) implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.



Slika 34. Konformeri najniže energije dobiveni Monte Carlo konformacijskom pretragom u a) liganda P u mediju dielektrične konstante 4 b) liganda R u mediju dielektrične konstante 4 c) liganda P u mediju dielektrične konstante 81 d) liganda R u mediju dielektrične konstante 81 e) liganda P u implicitnom modelu oktanola f) liganda R u implicitnom modelu oktanola g) liganda P u implicitnom modelu vode h) liganda R u implicitnom modelu vode. Vodikove veze su prikazane iscrtkanom crvenom linijom.

Životopis

Rođena sam 5.4.1994. godine u Karlovcu, gdje sam odrasla i završila osnovnu školu. Nakon osnovne upisala sam prirodoslovno-matematički smjer Gimnazije Karlovac, a potom 2013. upisujem Preddiplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završavam 2016. kada upisujem Diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Volontirala sam na znanstveno-popularizacijskim događajima kao što su Noć biologije, Otvoreni dan kemijskog odsjeka te na Simpoziju studenata biologije. Članica sam Kinokluba Karlovac i u slobodno se vrijeme bavim izradom filmova.